

**PENGARUH DIET MINYAK JELANTAH TERHADAP
EKSPRESI F2-ISOPROSTANES DAN APOPTOSIS SEL β PANKREAS
TIKUS PUTIH (*RATTUS NOVERGICUS STRAIN WISTAR*)**

KARYA AKHIR

Diajukan Guna Melengkapi Tugas-Tugas dan Untuk Memenuhi Persyaratan
Memperoleh Gelar Dokter Spesialis Penyakit Dalam



Disusun oleh :
Dr. Widy Helen

Pembimbing :
DR.dr. Achmad Rudijanto, SpPD-KEMD
Dr. Putu Moda Arsana, SpPD-KEMD

**Program Pendidikan Dokter Spesialis (PPDS) I Ilmu Penyakit Dalam
Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya
Rumah Sakit Umum Dr. Saiful Anwar
Malang
2010**

LEMBAR PENGESAHAN KARYA AKHIR

**PENGARUH DIET MINYAK JELANTAH TERHADAP
EKSPRESI F2-ISOPROSTANES DAN APOPTOSIS SEL β PANKREAS
TIKUS PUTIH (*RATTUS NOVERGICUS STRAIN WISTAR*)**

Diajukan Guna Melengkapi Tugas-Tugas Dan Untuk Memenuhi Salah Satu Syarat
Memperoleh Gelar Dokter Spesialis Ilmu Penyakit Dalam

Oleh:

Dr. Widy Helen

NIM. 0620702003-02

Menyetujui:

Pembimbing I

Pembimbing II

(DR.Dr.Achmad Rudianto,SpPD-KEMD)

NIP. 19470417 197903 1 001

(Dr.Putu Moda Arsana,SpPD-KEMD)

NIP. 19560503 198403 1 008

Mengetahui:

KPS Ilmu Penyakit Dalam

FKUB – RSUD Dr.Saiful Anwar Malang

(Prof. DR. Dr. Harijono Achmad, SpPD-KGEH)

NIP. 19450212 197702 1 001

KATA PENGANTAR

Segala puji syukur kami panjatkan ke hadirat Tuhan Yang Maha Esa atas segala berkat dan karunia-Nya sehingga kami dapat menyelesaikan laporan hasil penelitian tugas akhir dengan judul **“Pengaruh Diet Minyak Jelantah Terhadap Ekspresi F2-Isoprostanes dan Apoptosis Sel β Pankreas Tikus Putih (*Rattus novergicus Strain Wistar*)”**. Laporan penelitian ini kami buat sebagai syarat untuk menyelesaikan Program Pendidikan Dokter Spesialis (PPDS) I Ilmu Penyakit Dalam di Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya/RSU Dr Saiful Anwar Malang.

Kami mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada semua pihak yang terlibat baik secara langsung maupun tidak langsung dalam penelitian ini. Semoga Tuhan membalas segala budi baik yang telah diberikan.

Kami menyadari sepenuhnya bahwa masih banyak kekurangan pada laporan penelitian ini sehingga kami menantikan kritik dan saran dari semua pihak agar penelitian ini menjadi lebih baik. Kami berharap semoga penelitian ini dapat bermanfaat bagi perkembangan Ilmu Kedokteran dan kepentingan kemanusiaan di masa mendatang.

Malang, Juni 2010

Penulis

UCAPAN TERIMA KASIH

Terselesaikannya penelitian ini tidak terlepas dari budi baik banyak pihak. Ucapan terima kasih dan penghargaan yang setinggi-tingginya kami ucapkan kepada semua pihak tersebut, terutama kepada:

1. DR.Dr. Achmad Rudianto, SpPD-KEMD dan Dr.Putu Moda Arsana,SpPD-KEMD selaku pembimbing penelitian yang mengarahkan, memotivasi, dan selalu memberikan jalan keluar sehingga akhirnya mampu menghantarkan kami sampai berhasil menyelesaikan hasil penelitian ini.
2. Prof.DR.Dr.Harijono Achmad,SpPD-KGEH sebagai Ketua Program Studi PPDS I Ilmu Penyakit Dalam FKUB Malang yang terus menerus mendorong kami mempercepat masa studi serta memberi kesempatan dalam penelitian ini.
3. Dr.Gatoet Ismanoe,SpPD-KPTI sebagai kepala Lab/SMF Ilmu Penyakit Dalam RSUD dr. Saiful Anwar Malang yang selalu memberi semangat kepada kami
4. Para Guru Besar Ilmu Penyakit Dalam: Prof.Dr.Djoko Wahono Soeatmadji,SpPD-KEMD, Prof.DR.Dr.Harijono Achmad,SpPD-KGEH, Prof.DR.Dr.Handono Kalim,SpPD-KR atas masukan, dukungan, dan saran dalam pelaksanaan penelitian ini.
5. Rektor Universitas Brawijaya atas kesempatan yang diberikan untuk mengikuti Program Pendidikan Dokter Spesialis I Ilmu Penyakit Dalam.

6. Direktur RSUD dr.Saiful Anwar Malang atas kesempatan yang diberikan untuk mengikuti Program Pendidikan Dokter Spesialis I Ilmu Penyakit Dalam di RSUD Dr.Saiful Anwar Malang.
7. Ketua Komite Etik RSUD dr.Saiful Anwar Malang, atas rekomendasi pelaksanaan penelitian ini.
8. Kepala Laboratorium Faal, Farmakologi, dan Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya atas segala bantuan dan fasilitasnya sehingga kami dapat menyelesaikan penelitian dengan baik.
9. Bapak Wibi Riawan,Ssi, yang telah membantu dalam pembacaan prepat penelitian.
10. Dina, mahasiswi S1 Ilmu Gizi, dan dr.Stefany AW, selaku rekan kerja dalam penelitian ini.
11. Semua staf pengajar dan supervisor di Lab/SMF Ilmu Penyakit Dalam FKUB/RSSA Malang yang dengan penuh kesabaran membimbing, mengarahkan, dan memperluas wawasan kami di bidang ilmu penyakit dalam dan telah memberikan masukan terhadap penelitian ini.
12. Direktur RSUD Panglima Sebaya – Tanah Grogot dan Bupati Kabupaten Paser Kalimantan Timur atas kesempatan yang diberikan untuk mengikuti Program Pendidikan Dokter Spesialis I Ilmu Penyakit Dalam di Malang.
13. Kedua orangtuaku, Soedjoko dan Sia Widya atas segala doa dan dukungan moril yang tiada henti.
14. Suami, papa mertua, dan mama mertua atas dukungan selama menempuh pendidikan.

15. Felicia Levina, anakku terkasih, atas segala pengorbanan, pengertian, dan sebagai sumber semangat dalam menjalani masa-masa pendidikan.
16. Drg.Henny Rahayu,SpKG, adikku, atas segala doa dan dukungan moril yang tiada henti.
17. Teman-teman seperjuangan: dr.Moh Ariful Munir, dr.Yunita Christiandari, dan dr.Andi Sulisty H atas dukungan serta semangat yang selalu diberikan selama menjalani pendidikan.
18. Akhirnya kepada semua pihak serta teman-teman sejawat yang tidak bisa kami sebutkan satu persatu yang dengan sukarela membantu dan memberi semangat selama masa pendidikan, kami menyampaikan rasa terima kasih yang tak terhingga. Tuhan pasti membalas segala budi baik yang telah diberikan.

DAFTAR ISI

| | Halaman |
|--|---------|
| HALAMAN JUDUL..... | i |
| LEMBAR PENGESAHAN KARYA AKHIR..... | ii |
| KATA PENGANTAR..... | iii |
| UCAPAN TERIMA KASIH..... | iv |
| DAFTAR ISI..... | vii |
| DAFTAR GAMBAR..... | ix |
| DAFTAR TABEL..... | x |
| DAFTAR LAMPIRAN..... | xi |
| DAFTAR SINGKATAN..... | xii |
| ABSTRAK..... | xiii |
| BAB I. PENDAHULUAN | |
| 1.1 Latar Belakang..... | 1 |
| 1.2 Perumusan Masalah..... | 3 |
| 1.3 Hipotesa..... | 5 |
| 1.4 Tujuan Penelitian..... | 6 |
| 1.5 Manfaat Penelitian..... | 7 |
| BAB II. TINJAUAN KEPUSTAKAAN | |
| 2.1. Minyak Jelantah Sebagai Sumber Asam Lemak Trans..... | 8 |
| 2.2. Kaitan Asam Lemak Trans dengan Ekspresi F2-Isoprostanes..... | 16 |
| 2.3. Kaitan Asam Lemak Trans dengan Apoptosis Sel Beta Pankreas..... | 21 |
| BAB III. KERANGKA KONSEP..... | 29 |
| BAB IV. METODE PENELITIAN | |
| 4.1 Desain Penelitian..... | 30 |

| | |
|--|----|
| 4.2 Tempat dan Waktu Penelitian..... | 30 |
| 4.3 Sampel Penelitian..... | 30 |
| 4.4 Jumlah Sampel..... | 31 |
| 4.5. Variabel Penelitian..... | 31 |
| 4.6. Kriteria Inklusi dan Eksklusi..... | 32 |
| 4.7 Bahan dan Alat..... | 32 |
| 4.8 Definisi Operasional..... | 34 |
| 4.9 Cara Kerja dan Pengumpulan Data..... | 35 |
| 4.10 Kerangka Kerja..... | 40 |
| 4.11 Analisa Hasil Penelitian..... | 41 |
| | |
| BAB V. HASIL PENELITIAN | |
| 5.1 Berat Badan Awal, Berat Badan Akhir, Peningkatan Berat Badan, dan Asupan Kalori Berdasarkan Tiga Jenis Diet..... | 42 |
| 5.2 Ekspresi F2-Isoprostanes dan Apoptosis Sel β Pankreas Berdasarkan Tiga Jenis Diet..... | 44 |
| | |
| BAB VI. PEMBAHASAN..... | |
| | |
| BAB VII. SIMPULAN DAN SARAN | |
| 7.1 Simpulan..... | 48 |
| 7.2 Saran..... | 56 |
| | |
| DAFTAR PUSTAKA..... | |
| | |
| LAMPIRAN..... | |

DAFTAR GAMBAR

| | | |
|--------------------|---|----|
| Gambar 2.1 | Oksidasi Linoleoyl-CoA yang Merupakan Asam Lemak Tak Jenuh Majemuk..... | 14 |
| Gambar 2.2 | Struktur Asam Lemak Cis dan Trans..... | 15 |
| Gambar 2.3 | Perbedaan Asam Oleic dan Elaidik..... | 15 |
| Gambar 2.4 | Efek Akumulasi Asam Lemak Bebas Terhadap Stres Retikulum Endoplasma, Stress Oksidatif, dan Apoptosis Sel..... | 17 |
| Gambar 2.5 | Peran Asam Lemak Trans Terhadap Atherosklerosis, Gangguan Jantung, Ruptur Plak, dan Diabetes..... | 20 |
| Gambar 2.6 | Jalur Pembentukan Prostaglandin..... | 20 |
| Gambar 2.7 | Oksidasi Asam Arakhidonat oleh Radikal Bebas..... | 16 |
| Gambar 2.8 | Skema Sel Islet..... | 22 |
| Gambar 2.9 | Ilustrasi Sel Islet pada Penderita Diabetes Mellitus Tipe 2..... | 22 |
| Gambar 2.10 | Metabolisme Glukosa dan Asam Lemak dalam Mitokondria..... | 23 |
| Gambar 3.1 | Kerangka Konsep..... | 29 |
| Gambar 4.2 | Kerangka Kerja..... | 40 |
| Gambar 5.1 | Grafik Perbandingan Ekspresi F2-Isoprostanes dan Apoptosis Sel β Pankreas..... | 47 |
| Gambar 5.2 | Diagram Batang Perbandingan Ekspresi F2-Isoprostanes dan Apoptosis Sel β Pankreas..... | 47 |
| Gambar 5.3 | Pewarnaan HE untuk Mengamati Sel β Pankreas..... | 47 |
| Gambar 5.4 | Pemeriksaan Imunohistokimia untuk Mengamati F2-Isoprostanes.... | 48 |

DAFTAR TABEL

| | | |
|------------------|---|----|
| Tabel 4.1 | Kelompok Perlakuan dan Pemeriksaan yang Dilakukan..... | 21 |
| Tabel 4.2 | Komposisi Bahan Makanan..... | 32 |
| Tabel 5.1 | Berat Badan Awal, Berat Badan Akhir, Peningkatan Berat Badan, dan Asupan Kalori..... | 43 |
| Tabel 5.2 | Ekspresi F2-Isoprostanes dan Apoptosis Sel β Pankreas..... | 44 |
| Tabel 5.3 | Perbedaan Rerata Ekspresi F2-Isoprostanes..... | 45 |
| Tabel 5.4 | Perbedaan Rerata Apoptosis Sel β Pankreas..... | 46 |

DAFTAR LAMPIRAN

LAMPIRAN 1. Tabel Berat Badan Tikus

LAMPIRAN 2. Intake Energi Pakan Tikus Diet Normal

LAMPIRAN 3. Intake Energi Pakan Tikus Diet Atherogenik

LAMPIRAN 4. Intake Energi Pakan Tikus Diet Minyak Jelantah

LAMPIRAN 5. Hasil Perhitungan Ekspresi F2-Isoprostanes

LAMPIRAN 6. Hasil Perhitungan Apoptosis Sel β Pankreas

LAMPIRAN 7. Analisis Data Menggunakan SPSS

LAMPIRAN 8. Lembar *Ethical Clearance*

DAFTAR SINGKATAN

| | |
|--------------------|---|
| Anova | Analysis of variance |
| β | Beta |
| $^{\circ}\text{C}$ | Celcius |
| C | Carbon |
| DA | Diet atherogenik |
| DAB | Diamino Benzidine |
| DMJ | Diet minyak jelantah |
| DN | Diet normal |
| DNA | Deoxyribo Nucleic Acid |
| E | Energi |
| FDA | Food and Drug Administration |
| H | Hidrogen |
| HE | Hematoxilen-Eosin |
| HDL | High Density Lipoprotein |
| LDL | Low Density Lipoprotein |
| NO | Nitric Oxide |
| OH | Hidroksil |
| PERK | Pancreatic endoplasmic reticulum kinase |
| ROS | Reactive Oxygen Species |
| TBARS | Thiobarbituric acid-reactive substances |
| UPR | Unfolded protein response |
| ZDF | Zucker Diabetic Fatty |

Abstrak

PENGARUH DIET MINYAK JELANTAH TERHADAP EKSPRESI F₂-ISOPROSTANES DAN APOPTOSIS SEL β PANKREAS TIKUS PUTIH (*RATTUS NOVERGICUS STRAIN WISTAR*)

Widy Helen*, Achmad Rudianto**, Putu Moda Arsana**

**Divisi Endokrinologi dan Penyakit Metabolik Ilmu Penyakit Dalam

*Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya /RSU Dr.Saiful Anwar Malang

Pendahuluan:

Diet minyak jelantah (DMJ) mengandung asam lemak *trans* yang terbentuk dari reaksi hidrogenasi parsial, oksidasi, dan pemanasan minyak kelapa sawit selama proses penggorengan. Konsumsi asam lemak *trans* jangka panjang meningkatkan stress oksidasi dan menyebabkan apoptosis sel β pankreas.

Tujuan:

Untuk mengetahui efek DMJ terhadap ekspresi F₂-Isoprostanes dan apoptosis sel β pankreas tikus wistar in vivo.

Metode:

Penelitian eksperimental selama 8 minggu terhadap 18 tikus wistar yang terbagi secara acak dalam 3 grup (n=6 untuk tiap grup) yaitu kelompok diet normal (DN), diet atherogenik (DA), dan DMJ. Ekspresi F₂-Isoprostanes diukur secara semikuantitatif dengan pewarnaan histokimia. Apoptosis sel- β dievaluasi dinilai dari pengkerutannya (*shrinkage*). Data dinyatakan dalam median (min-maks) untuk F₂-isoprostanes; dan mean \pm SD untuk apoptosis sel- β . Analisa statistik menggunakan *one-way ANOVA* diikuti uji Tuckey untuk apoptosis sel- β dan Kruskal-Wallis diikuti uji Mann-Whitney untuk ekspresi F₂-Isoprostanes.

Hasil:

Ekspresi F₂-Isoprostanes meningkat pada DMJ dan DA dibandingkan dengan DN [33(28-39) dan 36(26-42) vs 3(3-9), p=0,002]. Apoptosis sel- β meningkat pada DMJ dan DA dibandingkan dengan DN [13,00 \pm 3,35 and 12,83 \pm 2,79 vs 2,33 \pm 1,21, p=0,000]. Tidak ada perbedaan bermakna pada DMJ dan DA terhadap ekspresi F₂-Isoprostanes ataupun apoptosis sel- β [33,00(28-39) vs 36(26-42), p=0,485; 13,00 \pm 3,35 vs 12,83 \pm 2,79, p=0,949].

Simpulan:

Ekspresi F₂-Isoprostanes dan apoptosis sel- β pankreas meningkat bermakna pada DMJ. Perlu penelitian lebih lanjut untuk menilai korelasi peningkatan ekspresi F₂-isoprostanes dan apoptosis sel- β .

Kata kunci: F₂-Isoprostanes, apoptosis sel- β , diet minyak jelantah.

Abstract

EFFECTS OF REUSED COOKING OIL DIET ON F₂-ISOPROSTANES EXPRESSION AND APOPTOSIS OF PANCREATIC β -CELL *RATTUS NOVERGICUS* STRAIN WISTAR

Widy Helen*, Achmad Rudianto**, Putu Moda Arsana**

**Division of Endocrinology and Metabolism, Department of Internal Medicine

*Faculty of Medicine, Brawijaya University/Dr.Saiful Anwar Hospital Malang, East
Java, Indonesia

Background:

Reused cooking oil diet (RCOD) has high trans fatty acid content as the result of partial hydrogenation, oxidation, and thermal alteration of palm oil during frying. Chronic trans fat consumption will promote oxidative stress mechanism and lead to β -cell apoptosis.

Objective:

To examine the effects of RCOD on F₂-Isoprostanes expression and apoptosis of wistar rats pancreatic β -cell in vivo.

Methods:

Experimental study on wistar rats. 18 Wistar rats were divided into three groups (n=6 for each) randomly, fed with Normal Diet (ND), Atherogenic Diet (AD), and RCOD respectively for 8 weeks. F₂-Isoprostanes expression was examined semiquantitatively by immunohistochemistry. β -cell apoptosis was evaluated through its shrinkage, by Hematoxylin-Eosin staining. Data were expressed in median and range for F₂-isoprostanes; and mean \pm SD for β -cell apoptosis. The statistical significance was assessed by one-way ANOVA followed by Tuckey post hoc test for β -cell apoptosis and Kruskal-Wallis followed by Mann-Whitney test for F₂-Isoprostanes expression.

Results:

F₂-Isoprostanes expression significantly increased in RCOD and AD compared to ND [33(28-39) and 36(26-42) vs 3(3-9), p=0.002]. β -cell apoptosis significantly increased in RCOD and AD compared to ND [13.00 \pm 3.35 and 12.83 \pm 2.79 vs 2.33 \pm 1.21, p=0.000]. There were no significant differences between RCOD and AD on F₂-Isoprostanes expression nor the apoptosis of β -cell [33.00(28-39) vs 36(26-42), p=0.485; 13.00 \pm 3.35 vs 12.83 \pm 2.79, p=0.949].

Conclusion:

F₂-Isoprostanes expression and pancreatic β -cell apoptosis significantly increased in RCOD compared to ND. Further investigation is needed to examine the correlation between the alteration of F₂-isoprostanes and β -cell apoptosis in RCOD and AD.

Keywords: F₂-Isoprostanes, β -cell apoptosis, reused cooking oil diet.

Bab I

Pendahuluan

1.1 Latar Belakang

Diet lemak sangat berpengaruh pada kesehatan manusia. Asam lemak utama yang terkandung dalam makanan adalah asam lemak jenuh (palmitat dan stearat), asam lemak tak jenuh tunggal (oleat), asam lemak tak jenuh ganda (linoleat dan linolenat), dan asam lemak trans. Asam lemak trans terbentuk dari hasil hidrogenasi minyak dan lemak yang mengandung asam lemak tak jenuh dengan bantuan suatu katalis. Proses hidrogenasi dengan katalis nikel ditemukan pertama kali oleh Paul Sabatier (seorang ahli kimia dari Jerman) pada abad ke-20. Bahan makanan yang banyak mengandung asam lemak *trans* adalah: margarine, biskuit, permen, makanan ringan, makanan yang digoreng, serta makanan yang dipanggang. Pada saat itu, proses hidrogenasi lemak, dipandang sebagai alternatif yang baik, karena menjadi lebih stabil dalam penyimpanan ataupun proses penggorengan, serta memberikan rasa yang lebih enak pada makanan.⁽²⁾ Tetapi sejak tahun 1990, mulai dilakukan berbagai penelitian untuk mengetahui efek negatif asam lemak *trans* terhadap kadar kolesterol serum. Suatu penelitian di tahun 1999 membuktikan adanya hubungan antara diet tinggi asam lemak *trans* dengan peningkatan kadar kolesterol LDL.⁽³⁾ Data meta-analisa membuktikan bahwa peningkatan asupan energi sebesar 2% dari asam lemak *trans* berkaitan dengan peningkatan kejadian penyakit jantung koroner sebesar 23%.⁽⁴⁾ Pada tanggal 1 Januari 2006, The US Food and Drug Administration (FDA)

mengeluarkan ketentuan supaya semua produk makanan mencantumkan kadar asam lemak *trans* pada setiap label kemasannya.⁽²⁾

Selain berpengaruh terhadap penyakit jantung dan pembuluh darah, data-data yang baru ternyata juga menyatakan bahwa ada hubungan antara asupan asam lemak *trans* dan diabetes tipe 2.⁽⁵⁾ Penelitian terhadap hewan maupun manusia membuktikan bahwa diet tinggi lemak menyebabkan resistensi insulin, terutama melalui gangguan sekresi insulin yang distimulasi oleh glukosa.⁽⁶⁾ Suatu penelitian terhadap 84.000 wanita juga menyatakan bahwa kejadian diabetes tipe 2 lebih besar pada mereka yang lebih banyak mengonsumsi asam lemak *trans*, dan sebaliknya kejadian diabetes tipe 2 lebih rendah pada mereka yang mengonsumsi asam lemak tak jenuh.⁽⁵⁾ Asam lemak *trans* dalam bentuk elaidoyl CoAs memperpanjang aktivasi kanal K_{ATP} , sehingga menurunkan eksitabilitas sel β pankreas dan berakibat pada penurunan sekresi insulin.⁽⁵⁾ Paparan kronis asam lemak pada sel β pankreas in vitro menyebabkan gangguan sekresi dan apoptosis, seperti yang terjadi pada diabetes tipe 2. Tingkat kejenuhan asam lemak sangat berperan. Asam lemak jenuh (misalnya: palmitat) lebih nyata menyebabkan apoptosis, sedangkan asam lemak tak jenuh (misalnya: oleat) tidak terlalu bersifat sitotoksik.⁽⁷⁾ Apoptosis diduga terjadi melalui beberapa mekanisme, yaitu: sintesa *Nitric Oxide* (NO)⁽⁸⁾, supresi faktor antiapoptosis seperti bcl-2, akumulasi trigliserida intraseluler⁽⁹⁾, pembentukan *reactive oxygen species* (ROS)⁽¹⁰⁾, aktivasi *nuclear factor- κ B*⁽¹¹⁾, penurunan sintesa kardiolipin fosfolipid mitokondria⁽¹²⁾, dan sintesa *ceramide*.⁽⁹⁾

Pada penelitian ini, kami akan meneliti hubungan diet asam lemak *trans* dengan ekspresi *f2-isoprostanes* dan apoptosis sel β pankreas hewan coba, yaitu tikus putih (*rattus novergicus Strain Wistar*). Bahan makanan yang dipakai adalah minyak jelantah, karena mengandung asam lemak *trans* dan merupakan bahan yang sering dipakai di masyarakat kita. Penggunaan minyak jelantah adalah hal yang biasa di masyarakat. Sebagian orang berpendapat makanan yang dicampur jelantah lebih sedap. Sebagian lagi karena keterdesakan ekonomi, apalagi di masa krisis ekonomi.

Apoptosis sel β pankreas dinilai dari jumlah sel β pankreas yang rusak. Peroksidase lemak diukur secara tidak langsung dari ekspresi *f2-isoprostanes*. *F2-isoprostanes* adalah komponen yang tersusun dari rangkaian cincin prostane prostaglandin F2 yang dihasilkan *in vivo* melalui reaksi peroksidase terkatalisasi asam arakhidonat oleh radikal bebas nonenzymatik.⁽¹³⁾ Pengukuran *F2-isoprostanes* memiliki beberapa keuntungan dibanding marker stres oksidatif yang lain, karena: lebih stabil secara kimiawi, merupakan produk spesifik peroksidasi, dihasilkan *in vivo*, jumlahnya dapat terdeteksi di semua jaringan normal dan cairan biologis sehingga dapat diketahui batasan normalnya, kadarnya meningkat secara substasial pada hewan coba dengan kerusakan oksidan, serta dapat menjadi dasar biokimia yang sensitif dalam penelitian penentuan dosis antioksidan.⁽¹⁴⁾

1.2 Perumusan Masalah

Perumusan masalah penelitian ini adalah sebagai berikut, yaitu:

1. Apakah ada perbedaan ekspresi *f2-isoprostanes* pada sel β pankreas tikus putih (*rattus novergicus Strain Wistar*) yang mendapat diet minyak jelantah dibandingkan dengan diet normal?
2. Apakah ada perbedaan ekspresi *f2-isoprostanes* pada sel β pankreas tikus putih (*rattus novergicus Strain Wistar*) yang mendapat diet minyak jelantah dibandingkan dengan diet atherogenik?
3. Apakah ada perbedaan ekspresi *f2-isoprostanes* pada sel β pankreas tikus putih (*rattus novergicus Strain Wistar*) yang mendapat diet normal dibandingkan dengan diet atherogenik?
4. Apakah ada perbedaan jumlah kerusakan sel β pankreas tikus putih (*rattus novergicus Strain Wistar*) yang mendapat diet minyak jelantah dibandingkan dengan diet normal?
5. Apakah ada perbedaan jumlah kerusakan sel β pankreas tikus putih (*rattus novergicus Strain Wistar*) yang mendapat diet minyak jelantah dibandingkan dengan diet atherogenik?
6. Apakah ada perbedaan jumlah kerusakan sel β pankreas tikus putih (*rattus novergicus Strain Wistar*) yang mendapat diet normal dibandingkan dengan diet atherogenik?

1.3 Hipotesa

1. Ekspresi *f2-isoprostan*es pada sel β pankreas tikus putih (*rattus novergicus Strain Wistar*) yang mendapat diet minyak jelantah lebih tinggi dibandingkan dengan diet normal.
2. Ekspresi *f2-isoprostan*es pada sel β pankreas tikus putih (*rattus novergicus Strain Wistar*) yang mendapat diet minyak jelantah lebih rendah dibandingkan dengan diet atherogenik.
3. Ekspresi *f2-isoprostan*es pada sel β pankreas tikus putih (*rattus novergicus Strain Wistar*) yang mendapat diet normal lebih rendah dibandingkan dengan diet atherogenik.
4. Jumlah kerusakan sel β pankreas tikus putih (*rattus novergicus Strain Wistar*) yang mendapat diet minyak jelantah lebih banyak dibandingkan dengan diet normal
5. Jumlah kerusakan sel β pankreas tikus putih (*rattus novergicus Strain Wistar*) yang mendapat diet minyak jelantah lebih sedikit dibandingkan dengan diet atherogenik.
6. Jumlah kerusakan sel β pankreas tikus putih (*rattus novergicus Strain Wistar*) yang mendapat diet normal lebih sedikit dibandingkan dengan diet atherogenik.

1.4 Tujuan Penelitian

1.4.1 Tujuan Umum

Mengetahui pengaruh pemberian diet minyak jelantah terhadap ekspresi *f2-isoprostanes* dan apoptosis sel β pankreas yang dinilai dari jumlah kerusakan sel β pankreas tikus putih (*rattus novergicus Strain Wistar*).

1.4.2 Tujuan Khusus

1. Mengetahui perbandingan ekspresi *f2-isoprostanes* pada sel β pankreas tikus putih (*rattus novergicus Strain Wistar*) yang mendapat diet minyak jelantah dengan yang mendapat diet normal.
2. Mengetahui perbandingan ekspresi *f2-isoprostanes* pada sel β pankreas tikus putih (*rattus novergicus Strain Wistar*) yang mendapat diet minyak jelantah dengan yang mendapat diet atherogenik.
3. Mengetahui perbandingan ekspresi *f2-isoprostanes* pada sel β pankreas tikus putih (*rattus novergicus Strain Wistar*) yang mendapat diet normal dengan yang mendapat diet atherogenik.
4. Mengetahui perbandingan jumlah kerusakan sel β pankreas tikus putih (*rattus novergicus Strain Wistar*) yang mendapat diet minyak jelantah dengan yang mendapat diet normal
5. Mengetahui perbandingan jumlah kerusakan sel β pankreas tikus putih (*rattus novergicus Strain Wistar*) yang mendapat diet minyak jelantah dengan yang mendapat diet atherogenik.

6. Mengetahui perbandingan jumlah kerusakan sel β pankreas tikus putih (*rattus novergicus Strain Wistar*) yang mendapat diet normal dengan yang mendapat diet atherogenik.

1.5 Manfaat Penelitian

1.5.1 Manfaat Klinis

Manfaat klinis penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh diet minyak jelantah terhadap kesehatan. Khususnya terhadap terjadinya stress oksidatif akibat peroksidase lemak yang dilihat secara tak langsung dari ekspresi *f2-isoprostanes* dan juga apoptosis sel β pankreas, sebagai salah satu faktor penyebab terjadinya diabetes tipe 2.

1.5.2 Manfaat Akademis

Manfaat akademis penelitian ini adalah untuk memberi masukan dalam pengembangan penelitian lebih lanjut mengenai keterkaitan antara diet yang menggunakan minyak jelantah dengan ekspresi *f2-isoprostanes* dan apoptosis sel β pankreas.

BAB II

TINJAUAN KEPUSTAKAAN

2.1 Minyak Jelantah Sebagai Sumber Asam Lemak Trans

Minyak adalah istilah umum untuk semua cairan organik yang tidak larut atau bercampur dengan air. Minyak tumbuhan dan hewan semuanya merupakan lipid. Dari sudut pandang kimia, minyak kelompok ini sama saja dengan lemak. Minyak dibedakan dari lemak berdasarkan sifat fisiknya pada suhu ruang: minyak berwujud cair sedangkan lemak berwujud padat. Minyak nabati serta lemak hewani adalah gliserida yang tersusun dari gliserol dan asam lemak. Asam lemak, bersama-sama dengan gliserol merupakan penyusun utama minyak nabati atau lemak dan merupakan bahan baku untuk semua lipida pada makhluk hidup. Asam ini mudah dijumpai dalam minyak masak (minyak goreng), margarin, ataupun lemak hewan. Secara alami, asam lemak biasa berbentuk bebas (karena lemak yang terhidrolisis) maupun terikat sebagai gliserida.⁽¹⁵⁾ Minyak goreng adalah hasil akhir (*refined oils*) dari sebuah proses pemurnian minyak nabati (golongan yang bisa dikonsumsi) dan terdiri dari beragam jenis senyawa trigliserida.⁽¹⁶⁾ Trigliserida mempunyai tiga jenis asam lemak. Dan untuk menganalisa karakteristik dari suatu minyak goreng maka jumlah kandungan asam lemak inilah yang dipakai sebagai tolok ukur.⁽¹⁶⁾

Minyak kelapa, sebagai salah satu jenis minyak goreng, mempunyai komposisi yang didominasi oleh asam lemak jenuh yaitu sebesar 92%, sedangkan sisanya adalah asam lemak tak jenuh tunggal sebesar 6% dan asam lemak tak jenuh ganda sebesar 2%. Minyak kelapa sawit mempunyai komposisi yang lebih seimbang,

yaitu mengandung asam lemak jenuh sebesar 52%, asam lemak tak jenuh tunggal sebesar 38%, dan asam lemak tak jenuh majemuk sebesar 10%. Titik didih minyak kelapa sawit adalah 230⁰C.⁽¹⁷⁾ Minyak kedelai sebaliknya, kandungan asam lemak tak jenuh mendominasi sampai 80%. Dengan kandungan asam lemak jenuh yang tinggi, minyak kelapa dan minyak kelapa sawit mempunyai keunggulan daripada minyak kedelai yaitu lebih stabil dan tidak mudah teroksidasi pada suhu tinggi.⁽¹⁶⁾

Minyak jelantah adalah minyak sisa menggoreng yang telah dipakai 3-4 kali.⁽¹⁸⁾ Minyak jelantah disukai karena alasan ekonomi dan rasanya juga lebih enak dibanding dengan menggunakan minyak baru.⁽¹⁶⁾ Untuk minyak jelantah, setelah menggoreng hendaknya minyak didinginkan dan kemudian disaring dengan menggunakan kain saring (saringan tahu) atau penyaring halus lainnya. Penyaringan akan menghilangkan sisa-sisa produk pangan yang gosong, sehingga akan mempengaruhi perubahan warna dan citarasa. Minyak goreng bekas pakai yang telah disaring, dapat disimpan pada tempat yang bersih dan di tempat yang gelap dan sejuk (*refrigerator*). Jika akan digunakan lagi, tambahkan sedikit minyak yang masih segar supaya jumlahnya tetap mencukupi. Dengan cara ini, minyak dapat digunakan untuk menggoreng sampai 4 atau 6 kali penggorengan.⁽¹⁹⁾

Minyak jelantah atau yang disebut juga minyak sisa merupakan minyak bekas dipakai menggoreng atau yang mengalami pemanasan berulang pada suhu tinggi. Hal ini menyebabkan terjadinya perubahan fisik dan kimia sehingga minyak menjadi rusak. Minyak ini menyimpan potensi bahaya besar bagi kesehatan karena berbagai perubahan kimia pada minyak tersebut akan menghasilkan zat-zat atau bahan-bahan

yang bersifat merusak bagi sel tubuh yang normal. Menurut ahli kesehatan, minyak goreng hanya boleh dipakai 2-4 kali menggoreng.⁽²⁰⁾ Sumber yang lain menyebutkan hasil penelitian bahwa minyak goreng aman dipakai sampai maksimal 3 kali menggoreng.^(18, 21)

Selama proses penggorengan, minyak mengalami berbagai proses yang menurunkan kualitasnya akibat paparan dengan oksigen, kelembaban bahan makanan, dan suhu tinggi sehingga terjadi hidrolisis, oksidasi, dan perubahan suhu, yang menghasilkan asam lemak bebas, *monoacylglycerols*, *diacylglycerols*, komponen *volatile*, komponen siklik, dan isomer geometrik dari asam lemak tak jenuh (bentuk *trans*).⁽²²⁾ Proses menggoreng akan membentuk asam lemak *trans* yang dihasilkan dari lemak yang mengalami pemanasan pada suhu $\geq 180^{\circ}\text{C}$. Induksi panas pada asam linoleat dan esternya pada suhu minimum 190°C , menyebabkan sekitar 35% asam linoleat alami (bentuk *cis*) akan dikonversi menjadi isomer *trans*. Hal ini disebabkan oleh asam tak jenuh ganda yang terkena suhu tinggi membentuk senyawa siklik.⁽²³⁾ Perubahan kimia pada minyak selama proses menggoreng adalah:

-Oksidasi Lemak

Proses ini dipicu oleh adanya cahaya (sinar ultraviolet), oksigen, air, ion-ion logam, dan suhu tinggi. Peningkatan suhu akan memacu oksidasi, apalagi bila ada ion Fe dan Cu. Produk primer proses oksidasi lemak adalah hidroperoksida yang bersifat tidak stabil dan mudah pecah menjadi senyawa dengan rantai karbon yang lebih pendek oleh radiasi energi tinggi, panas, katalis logam, atau enzim.⁽²⁴⁾ Hasil dari oksidasi ini adalah senyawa-senyawa

radikal: aldehid, keton, asam, hidrokarbon, dan lain-lain.⁽²⁵⁾ Makin banyak kandungan asam lemak tak jenuh ganda dibandingkan asam lemak jenuh, makin besar pula reaksi oksidasi lemak yang terjadi.⁽²⁶⁾

-Hidrolisis

Proses ini dapat terjadi dengan adanya air (tergantung kelembaban bahan makanan) dan suhu tinggi, sehingga ikatan lemak terhidrolisis menjadi asam lemak bebas, *monoacylglycerols*, *diacylglycerols*, dan gliserol.⁽²⁷⁾ Hidrolisis sangat mudah terjadi pada lemak dengan asam lemak rantai pendek (lebih kecil dari C14).⁽²⁸⁾ Asam lemak bebas dan gliserol yang terbentuk dari hasil pemanasan minyak goreng bila dikonsumsi akan dicerna sebagaimana lemak lainnya. Miselus garam empedu sebagai medium transport untuk mengangkut asam lemak bebas dan gliserol diabsorpsi oleh sel-sel epitel usus. Asam lemak dan monogliserida diambil oleh retikulum endoplasma halus dan direkombinasi membentuk trigliserida. Trigliserida ini berkumpul di aparatus golgi menjadi gelembung yang mengandung kolesterol dan fosfolipid yang sudah diabsorpsi dan sejumlah kecil kolesterol dan fosfolipid yang baru disintesa. Ditambah dengan apoprotein yang menutupi sebagian permukaan gelembung, untuk selanjutnya diekskresikan ke dalam limfe sebagai kilomikron.⁽²⁹⁾

-Hidrogenasi

Proses ini juga terjadi pada minyak goreng karena terjadi induksi panas pada suhu $\geq 190^{\circ}\text{C}$. Asam lemak bentuk *cis* akan dikonversi menjadi bentuk *trans*.

Hal ini disebabkan oleh asam lemak tak jenuh ganda bila terkena suhu tinggi akan membentuk senyawa siklik.⁽³⁰⁾ Perubahan asam lemak *cis* menjadi *trans* sebanding dengan kenaikan suhu.

-Polimerisasi

Proses ini akan meningkatkan viskositas minyak dan timbulnya buih.⁽²³⁾

Berikut ini beberapa senyawa yang dihasilkan dari minyak karena proses penggorengan:⁽²⁵⁾

a. Volatile

Selama menggoreng, reaksi oksidatif melibatkan pembentukan dan dekomposisi hidroperoksid seperti senyawa aldehid jenuh dan tidak jenuh, keton, hidrokarbon, lakton, alkohol, dan ester. Setelah minyak dipanaskan selama 30 menit pada suhu 180⁰C, dengan kehadiran udara maka produk-produk *volatile* primer dapat dideteksi menggunakan kromatografi gas.

b. Senyawa-senyawa polar non polimer (asam hidroksi dan apoksi)

Senyawa-senyawa ini dihasilkan dari berbagai jalur oksidasi, termasuk juga radikal alkoksi.

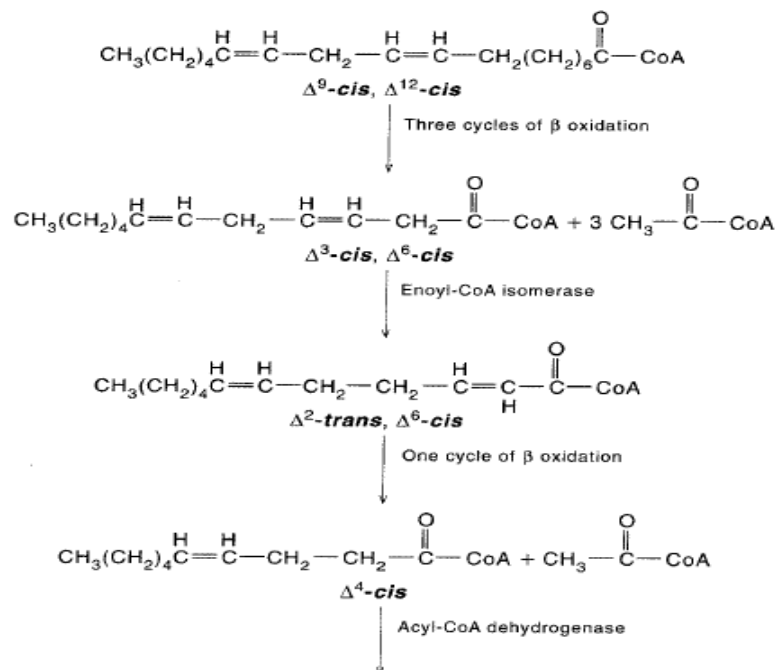
c. Asam dimer dan polimer

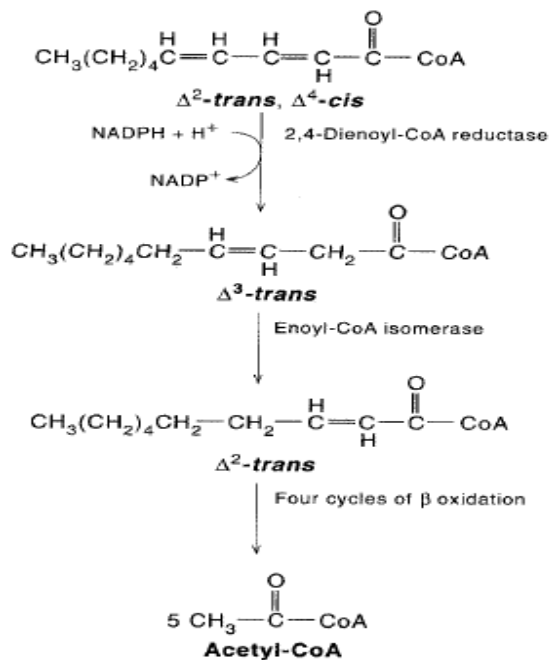
Senyawa-senyawa ini diduga terjadi dari kombinasi oksidatif dan panas atas radikal bebas. Polimerisasi menyebabkan peningkatan viskositas minyak goreng.

d. Asam Lemak Bebas

Senyawa ini timbul akibat hidrolisis triasilgliserol dengan kehadiran panas dan air.

Asam lemak *trans* adalah hasil oksidasi asam lemak tak jenuh pada suhu tinggi. Banyak peneliti telah mengetahui bahwa asam lemak *trans* ini sangat berbahaya bagi kesehatan karena menjadi salah satu penyebab penyakit kanker. Sampai saat ini, asam lemak *trans* belum bisa dihilangkan 100% dari produk makanan, namun yang bisa dilakukan adalah mengurangi kadarnya hingga batas aman.⁽¹⁶⁾

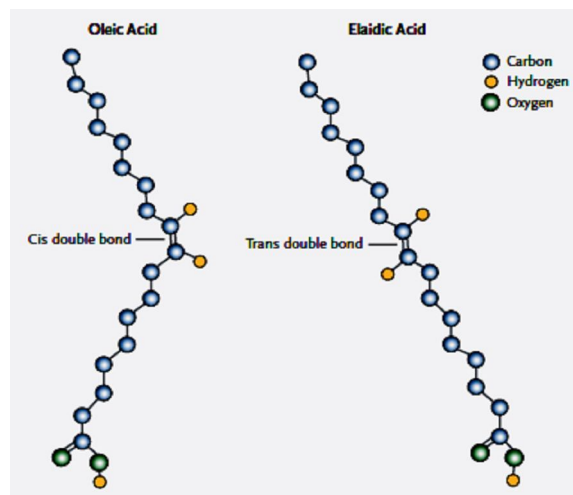




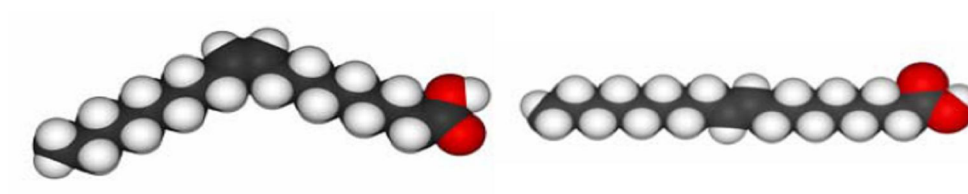
Gambar 2.1 Oksidasi *linoleoyl-CoA* yang merupakan asam lemak tak jenuh majemuk.⁽³¹⁾

Diet lemak terdiri dari asam lemak dan gliserol. Asam lemak secara umum diklasifikasikan sebagai asam lemak jenuh, asam lemak tak jenuh tunggal, dan asam lemak tak jenuh majemuk.⁽³²⁾ Asam lemak *trans* adalah suatu tipe dari asam lemak tak jenuh (baik tunggal maupun majemuk). Secara alami, asam lemak *trans* hanya ditemukan dalam jumlah kecil (2-5%) di dalam produk daging dan susu dari hewan pemamah biak. Asam lemak *trans* lebih banyak dihasilkan dari proses hidrogenasi parsial pada minyak tanaman dan lemak hewan di industri makanan (mencapai 45% dari total lemak).⁽³³⁾ Secara kimiawi, asam lemak *trans* punya struktur yang mirip dengan yang bukan bentuk *trans*. Contohnya adalah pada gambar berikut menunjukkan bahwa asam *oleic* dan *elaidik* sama-sama tersusun dari 18 karbon asam lemak dengan satu ikatan ganda. Asam *oleic* punya ikatan ganda bentuk *cis* (atom

hidrogen berada pada sisi yang sama), yang menyebabkan lekukan pada rantai asam lemak. Sementara itu, asam *elaidik* punya ikatan ganda bentuk *trans* (atom hidrogen berada di sisi yang berlawanan), sehingga rantai asam lemak berbentuk lurus dan lebih kuat. Akibat polarisasi atom H, asam lemak *cis* memiliki rantai yang melengkung. Asam lemak *trans* karena atom H-nya berseberangan tidak mengalami efek polarisasi yang kuat dan rantainya tetap relatif lurus.⁽⁴⁾



Gambar 2.2 Struktur asam lemak *cis* dan *trans*.⁽⁴⁾



Gambar 2.3 Perbedaan asam *oleic* (kiri) dan *elaidik* (kanan) dapat dikenali dengan menghitung jumlah atom karbon di sisi atas dan bawah dari molekulnya.⁽³³⁾

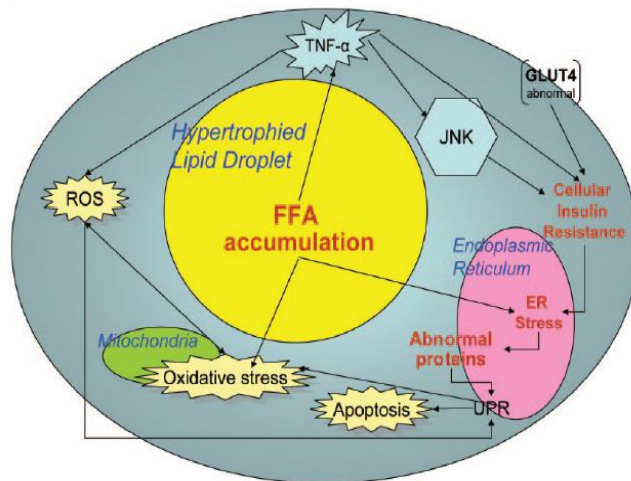
2.2 Kaitan Asam Lemak Trans dengan Ekspresi F2-Isoprostanes

Asam lemak *trans* seperti halnya asam lemak jenuh, meningkatkan kadar *low-density lipoprotein* (LDL) dan menurunkan kadar HDL. Makin tinggi rasio LDL/HDL, makin banyak gangguan yang ditimbulkan.⁽³⁴⁾ Hasil meta analisa dari 12 penelitian dengan randomisasi terkontrol pada bulan November 2005 tentang efek penggantian diet isokalori asam lemak jenuh ataupun asam lemak tak jenuh bentuk *cis* dengan diet asam lemak *trans*, terhadap kadar lemak serum, disebutkan ternyata dengan diet asam lemak *trans* terjadi peningkatan kadar LDL, penurunan kadar HDL, dan peningkatan rasio LDL/HDL. Selain itu, juga terjadi peningkatan kadar trigliserida dan Lp(a) lipoprotein, serta mengurangi ukuran partikel LDL.⁽⁴⁾

Asam lemak *trans* dimetabolisme secara berbeda oleh hati jika dibandingkan dengan jenis lemak yang lain serta dipengaruhi oleh enzim *delta-6-desaturase* yang terlibat dalam konversi asam lemak esensial menjadi asam arakidonat dan prostaglandin. Asam arakidonat dan prostaglandin punya peran penting pada fungsi sel. Asam lemak *trans* tidak dapat dimetabolisme untuk biotransformasi secara normal di hati. Asam lemak yang tidak dapat dimetabolisme akan kembali ke aliran darah dan disimpan di dalam sel lemak, sehingga menjadi faktor resiko obesitas permanen.⁽³⁵⁾

Kelebihan asam lemak di jaringan non-adiposit yang melebihi kemampuan kapasitas seluler untuk menyimpan asam lemak dalam bentuk trigliserida atau untuk mengoksidasi asam lemak sebagai sumber energi, dapat menyebabkan terbentuknya

reactive oxygen species (ROS) yang selanjutnya akan menginduksi stres pada *endoplasmic reticulum*.⁽³⁶⁾



Gambar 2.4 Efek akumulasi asam lemak bebas terhadap stres retikulum endoplasma, stress oksidatif, dan apoptosis sel.⁽¹⁾

Sedangkan stres oksidatif terjadi akibat ketidakseimbangan antara peningkatan paparan terhadap radikal bebas dan pertahanan antioksidan, baik antioksidan berberat molekul kecil seperti glutathion ataupun enzim antioksidan seperti superoksida dismutase. Radikal bebas dapat berasal dari sumber endogen seperti mitokondria dan pembakaran oksidasi selama terjadinya aktifitas fagositosis, ataupun sumber eksogen seperti toksin dan rokok. Radikal bebas merusak struktur biomolekuler seperti DNA, lemak, dan protein. Target utama serangan radikal bebas adalah lemak, sehingga terjadilah peroksidasi lemak. Induksi peroksidasi oleh radikal bebas terhadap membran lemak dapat sangat merusak karena menyebabkan kelainan komponen biofisika membran, seperti derajat kelembaban cairan sehingga terjadi inaktivasi enzim ataupun reseptor yang terikat pada membran. Akibatnya adalah terjadi gangguan fungsi seluler.⁽¹³⁾ Reaksi peroksidase lemak diawali dengan serangan hidroksil (OH^\bullet) terhadap atom hidrogen. Asam lemak tak jenuh ganda lebih rentan terhadap serangan radikal hidroksil (OH^\bullet) dibandingkan asam lemak tak jenuh

tunggal dan asam lemak jenuh. Adanya ikatan rangkap, terutama yang berada di kedua sisi rantai $-\text{CH}_2-$ (*bis-allylic hydrogen*) akan melemahkan ikatan atom hidrogen dengan atom karbon.⁽³⁷⁾

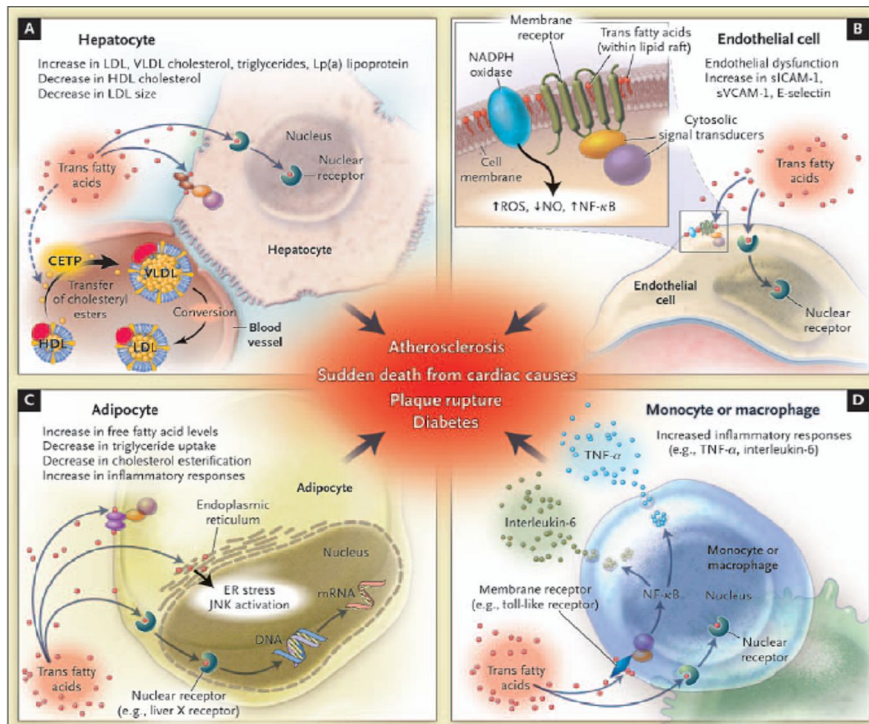
Berbagai metode telah dicoba untuk mengukur peroksidase lemak secara langsung, tetapi belum ada yang memuaskan. Pengukuran radikal bebas juga sulit karena bersifat sangat reaktif, punya waktu paruh yang sangat singkat, dan konsentrasinya sangat rendah. Yang bisa dilakukan adalah mengukur terjadinya reaksi peroksidase lemak secara tidak langsung, yaitu dengan mengukur *thiobarbituric acid-reactive substances* (TBARS), hidroperoksida, dan *f2-isoprostanes* sebagai petanda reaksi peroksidase lemak.⁽³⁸⁾ Saat ini, *f2-isoprostanes* dianggap sebagai petanda yang baik untuk mengetahui status stres oksidatif dan peroksidase lemak in vivo.⁽¹⁴⁾

F2-isoprostanes adalah komponen yang tersusun dari rangkaian cincin prostane prostaglandin F2 yang dihasilkan in vivo melalui reaksi peroksidase terkatalisasi asam arakhidonat oleh radikal bebas nonenzymatik melalui jalur siklooksigenase. Pengukuran *f2-isoprostanes* sangat bermanfaat untuk mengetahui status stres oksidatif in vivo yang memegang peranan penting dalam patogenesis berbagai penyakit akut ataupun kronis termasuk kanker, penyakit kardiovaskuler, paru, ginjal, hati, neurodegeneratif, dan bahkan proses penuaan normal.⁽¹³⁾ Suatu penelitian pada wanita usia pertengahan menyatakan bahwa asupan asam lemak *trans* yang lebih tinggi berhubungan dengan peningkatan kadar *f2-isoprostanes* dalam

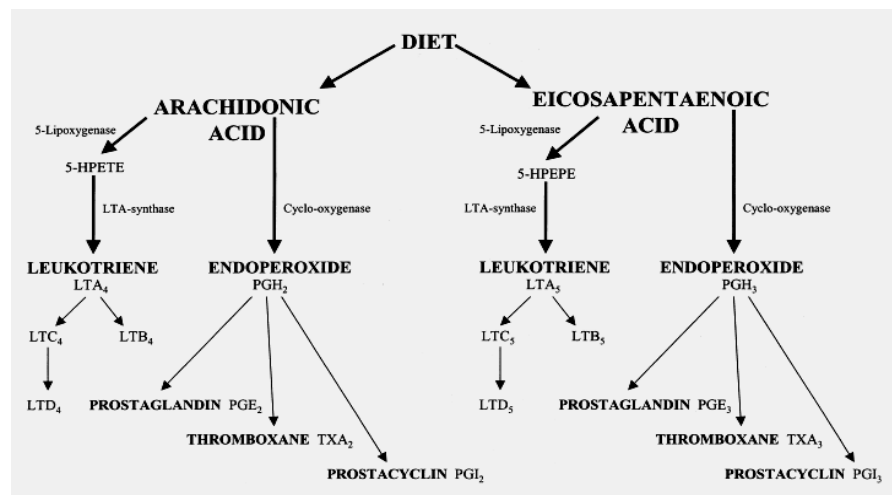
urine.⁽³⁹⁾ Pengukuran *f2-isoprostanes* memiliki beberapa keuntungan dibanding marker stres oksidatif yang lain, karena:

1. Stabil secara kimiawi.
2. Merupakan produk spesifik peroksidasi.
3. Dihasilkan in vivo.
4. Jumlahnya dapat terdeteksi di semua jaringan normal dan cairan biologis, sehingga dapat diketahui batasan normalnya.
5. Kadarnya meningkat secara substasial pada hewan coba dengan kerusakan oksidan.
6. Dapat menjadi dasar biokimia yang sensitif dalam penelitian penentuan dosis antioksidan.⁽¹⁴⁾

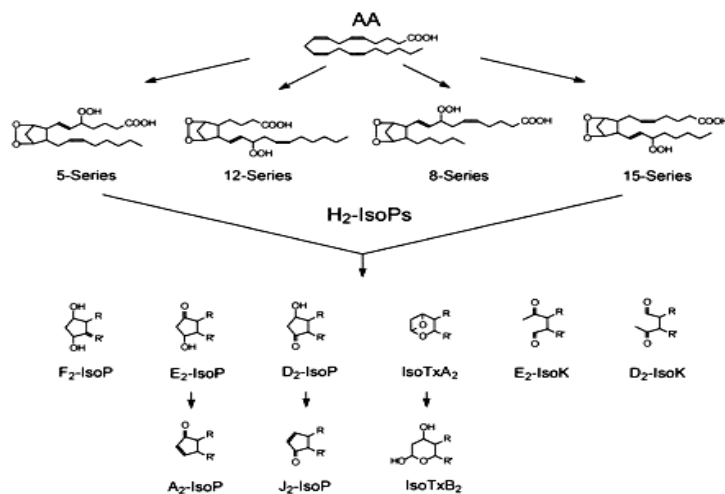
Pembentukan *F2-isoprostanes* meningkat selama oksidasi LDL in vitro⁽⁴⁰⁾ dan berperan dalam efek proadesif pada neutrofil yang diinduksi oleh oksidasi minimal LDL.⁽¹¹⁾



Gambar 2.5 Peran asam lemak *trans* terhadap aterosklerosis, gangguan jantung, ruptur plak, dan diabetes.⁽⁴⁾



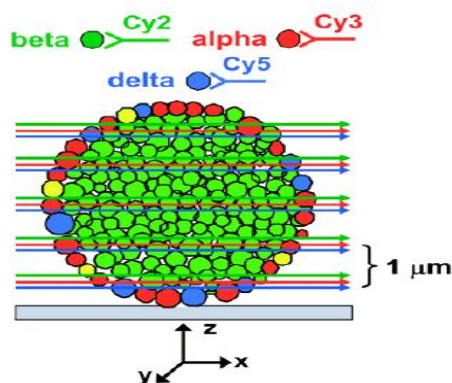
Gambar 2.6 Jalur Pembentukan Prostaglandin.⁽⁴¹⁾



Gambar 2.7 Oksidasi asam arakhidonat oleh radikal bebas. (Tx: thromboxane. IsoK: isoketals)⁽¹³⁾

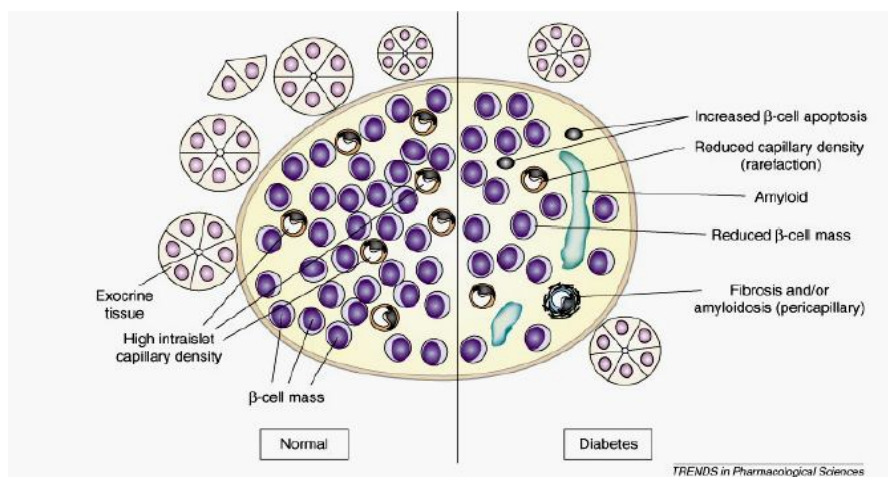
2.3 Kaitan Asam Lemak Trans dengan Apoptosis Sel Beta Pankreas

Sel islet Langerhans terdiri dari 4 tipe utama sel endokrin, yaitu sebagai inti adalah sel β yang memproduksi insulin, serta sel α , sel δ , dan sel PP (ketiganya tersusun sebagai lapisan luar). Jumlah sel islet pada orang dewasa normalnya sekitar 2 juta islet, dengan berat sekitar 2% dari berat pankreas. Komposisi sel β adalah 65-80% dari sel islet dan berperan pada sintesa dan sekresi hormon insulin sebagai respon terhadap nutrisi, hormone, dan syaraf, untuk mempertahankan homeostasis glukosa.⁽⁴²⁾



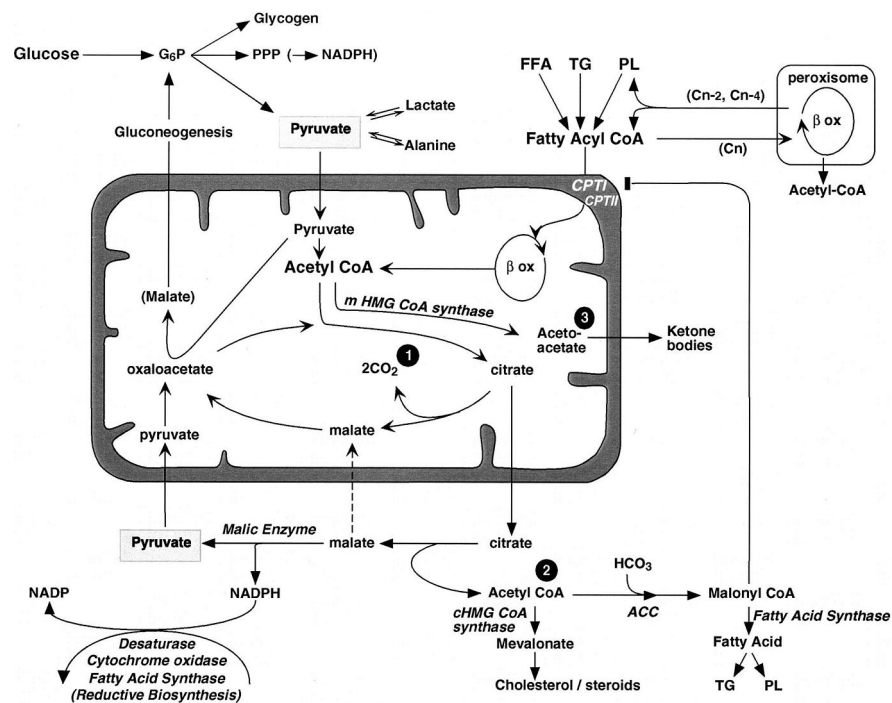
Gambar 2.8 Skema Sel Islet.⁽⁴³⁾

Sel islet normal, dipertahankan oleh keseimbangan antara mekanisme apoptosis dan neogenesis (proliferasi dan diferensiasi). Ketidakseimbangan mekanisme tersebut dapat terjadi akibat faktor genetik, serta derajat glukotoksisitas dan lipotoksisitas. Pada penderita diabetes tipe 2, terjadi penurunan massa sel β , peningkatan apoptosis sel β , penurunan densitas kapiler, serta fibrosis ataupun amyloidosis perikapiler.⁽⁴⁴⁾



Gambar 2.9 Ilustrasi sel islet pada penderita diabetes mellitus tipe 2.⁽⁴⁴⁾

Penelitian terhadap hewan maupun manusia membuktikan bahwa diet tinggi lemak menyebabkan resistensi insulin, terutama melalui gangguan sekresi insulin yang distimulasi oleh glukosa.⁽⁶⁾ Suatu penelitian terhadap 84.000 wanita juga menyatakan bahwa kejadian diabetes tipe 2 lebih besar pada mereka yang lebih banyak mengonsumsi asam lemak *trans*, dan sebaliknya kejadian diabetes tipe 2 lebih rendah pada mereka yang mengonsumsi asam lemak tak jenuh.⁽⁵⁾



Gambar 2.10 Metabolisme glukosa dan asam lemak dalam mitokondria.⁽⁴⁵⁾

Asam lemak *trans* mengalami proses pencernaan dari lambung sampai dengan usus halus bagian proksimal dan diabsorpsi oleh tubuh.⁽⁴⁶⁾ Berbeda dengan asam lemak rantai pendek atau medium (atom karbon ≤ 10) yang diabsorpsi oleh aliran darah portal tanpa mengalami esterifikasi sehingga dapat dibersihkan dari aliran darah oleh hati, maka asam lemak *trans* memiliki rantai yang lebih panjang dan adanya ikatan rangkap bentuk *trans* sehingga mengalami re-esterifikasi menjadi bentuk trigliserida setelah berikatan dengan gliserol. Trigliserida akan digunakan dalam biosintesis lipoprotein intestinal (kilomikron) yang akan dibawa ke kelenjar limfe mesenterika dan masuk ke aliran darah seluruh tubuh lewat duktus limfatikus thorakalis. Selain kilomikron, lemak juga dibawa dalam bentuk *very-low-density lipoproteins* (VLDL). Asam lemak bebas akan dilepaskan dari trigliserida pada kilomikron dan VLDL dengan bantuan enzim lipoprotein lipase.⁽⁴⁷⁾ Asam lemak bebas akan dioksidasi di mitokondria (gambar 2.10). Supaya dapat masuk ke dalam mitokondria, asam lemak bebas harus diaktifkan terlebih dahulu di luar membran mitokondria. Aktivasi dilakukan oleh adenosin trifosfat (ATP), yang memacu pembentukan ikatan tioester antara gugus karboksil asam lemak dan gugus sulfhidril pada KoA dengan bantuan enzim asil-koA-sintetase sebagai katalis. Asam lemak rantai panjang aktif akan melewati membran mitokondria dengan cara mengkonjugasikannya dengan karnitin, yaitu suatu senyawa yang terbentuk dari lisin. Gugus asil dipindahkan dari atom sulfur pada KoA ke gugus hidroksil pada karnitin dan membentuk asil karnitin. Reaksi ini dikatalis oleh enzim karnitin palmitoil transferase I yang terikat di luar membran mitokondria. Enzim ini diinduksi dengan

kuat oleh *peroxisome proliferator-activated receptors* (PPAR) dan asam lemak.⁽⁴⁵⁾ Selanjutnya asil karnitin akan melintasi membran ke dalam mitokondria oleh suatu *translokase*. Gugus asil dipindahkan lagi ke KoA pada sisi matriks dari membran yang dikatalisis oleh karnitin asil transferase II. Akhirnya karnitin dikembalikan lagi ke sisi sitosol oleh *translokase* menggantikan masuknya asil karnitin yang masuk. Molekul asil KoA rantai pendek dan sedang, dapat menembus membran mitokondria tanpa karnitin.⁽⁴⁷⁾ Proses β -oksidasi di mitokondria diregulasi oleh PPAR α dengan cara memodulasi ekspresi gen MCAD (*medium-chain acyl-CoA dehydrogenase*).⁽⁴⁵⁾ Asil KoA jenuh akan dipecah melalui urutan reaksi yang berulang yaitu: oksidasi oleh flavin adenin dinukleotida (FAD), hidrasi oleh NAD, dan tiolisis oleh KoA. Rantai asil diperpendek dengan dua atom karbon sebagai hasil dari rangkaian reaksi tersebut. Hasil oksidasi asam lemak bebas adalah FADH, NADH, dan asetil KoA. NADH dan FADH akan masuk ke dalam sistem transport elektron menghasilkan adenosine triphosphate (ATP) dan air (H₂O). Kondensasi asetil KoA dengan asam oksaloasetat akan masuk ke dalam siklus asam sitrat dan dioksidasi menjadi karbondioksida (CO₂) atau dibawa keluar dari mitokondria lagi menjadi asam lemak bebas. Selain ATP, ternyata setiap reaksi oksidasi juga disertai pelepasan radikal bebas.⁽⁴⁸⁾ Pada paparan kronis asam lemak *trans*, terutama bila dalam jumlah yang berlebihan, akan menyebabkan peningkatan akumulasi asam lemak bebas di hati. Akibatnya juga akan meningkatkan akumulasi NADH, FADH, dan asetil KoA di mitokondria.⁽⁴⁷⁾

Pada gambar 2.10 dapat terlihat bahwa asetil KoA yang dihasilkan dari tiap siklus β -oksidasi asam lemak di mitokondria dapat mengalami tiga proses penting, yaitu:

- 1) Asetil KoA bersama dengan oksaloasetat (yang berasal dari jalur glikolitik oleh piruvat) akan membentuk sitrat yang dapat masuk ke siklus asam sitrat untuk melengkapi proses oksidasi sehingga menghasilkan CO_2 dan ATP.
- 2) Sitrat hasil kondensasi asetil KoA dengan oksaloasetat dapat dikeluarkan dari mitokondria untuk sintesa asam lemak yang baru ataupun kolesterol dengan bantuan *cHMG-CoA synthase*.
- 3) Jika kadar oksaloasetat rendah atau bahkan tidak ada karena habis terpakai untuk glukoneogenesis, maka sebagian besar asetil KoA dengan bantuan *mHMG-CoA synthase* akan diubah menjadi benda keton (asetoasetat dan 3-hidroksibutirat).⁽⁴⁵⁾

Pada metabolisme terjadi stereospesifisitas dimana *trans*-isomer lebih cepat dihidrolasi daripada *cis*-isomer, dimana oksidasi adalah jalur yang penting dalam metabolisme.⁽⁴⁹⁾

Asam lemak *trans* dalam bentuk *elaidoyl CoAs* memperpanjang aktivasi kanal K_{ATP} , sehingga menurunkan eksitabilitas sel β pankreas dan berakibat pada penurunan sekresi insulin. Aktivasi kanal K_{ATP} oleh *trans*-isomer ini dipertahankan lebih lama daripada *cis*-isomernya (*oleoyl CoA*).^(5, 50) Glukosa masuk ke dalam sel melalui system transport aktif dan dimetabolisme menghasilkan ATP. Peningkatan

ATP menyebabkan penutupan kanal K-ATP sehingga terjadi depolarisasi membrane plasma. Kanal kalsium terbuka, sehingga kalsium masuk ke dalam sel dan menyebabkan sekresi insulin.⁽⁵¹⁾

Paparan kronis asam lemak bebas pada sel β pankreas (lipotoksisitas) menyebabkan gangguan sekresi insulin, gangguan ekspresi gen insulin, dan apoptosis sel β pankreas, seperti yang terjadi pada diabetes tipe 2. Akumulasi lemak intra islet (*steatosis*) akan mengganggu fungsi sel β pankreas.⁽⁵²⁾ Berdasarkan *fuel concept* dan hipotesis *Randle cycle*, pengaruh asam lemak bebas pada sekresi insulin berhubungan dengan supresi *uptake* glukosa perifer, stimulasi glukoneogenesis di hati, dan gangguan pengenalan glukosa pada *islet*, serta oksidasi asam lemak.⁽⁵³⁾

Akumulasi lemak yang berlebihan menyebabkan stres pada retikulum endoplasma dengan salah satu manifestasi selulernya adalah *unfolded protein response* (UPR). Pada pankreas, adanya *unfolded protein* yang berlebihan akan mengaktifasi *pancreatic endoplasmic reticulum kinase* (PERK) yang berfungsi dalam fosforilasi eIF2- α dan menurunkan translasi protein. Pada akhirnya, jika keseimbangan sel dan retikulum endoplasma terus terganggu sehingga terbentuk protein abnormal dalam jumlah yang berlebihan, UPR akan menginduksi apoptosis (program kematian sel).⁽⁵⁴⁾

Tingkat kejenuhan asam lemak juga sangat berperan. Asam lemak jenuh (misalnya: palmitat) lebih nyata menyebabkan apoptosis, sedangkan asam lemak tak jenuh (misalnya:oleat) tidak terlalu bersifat sitotoksik.⁽⁷⁾

Apoptosis diduga terjadi melalui beberapa mekanisme, yaitu:

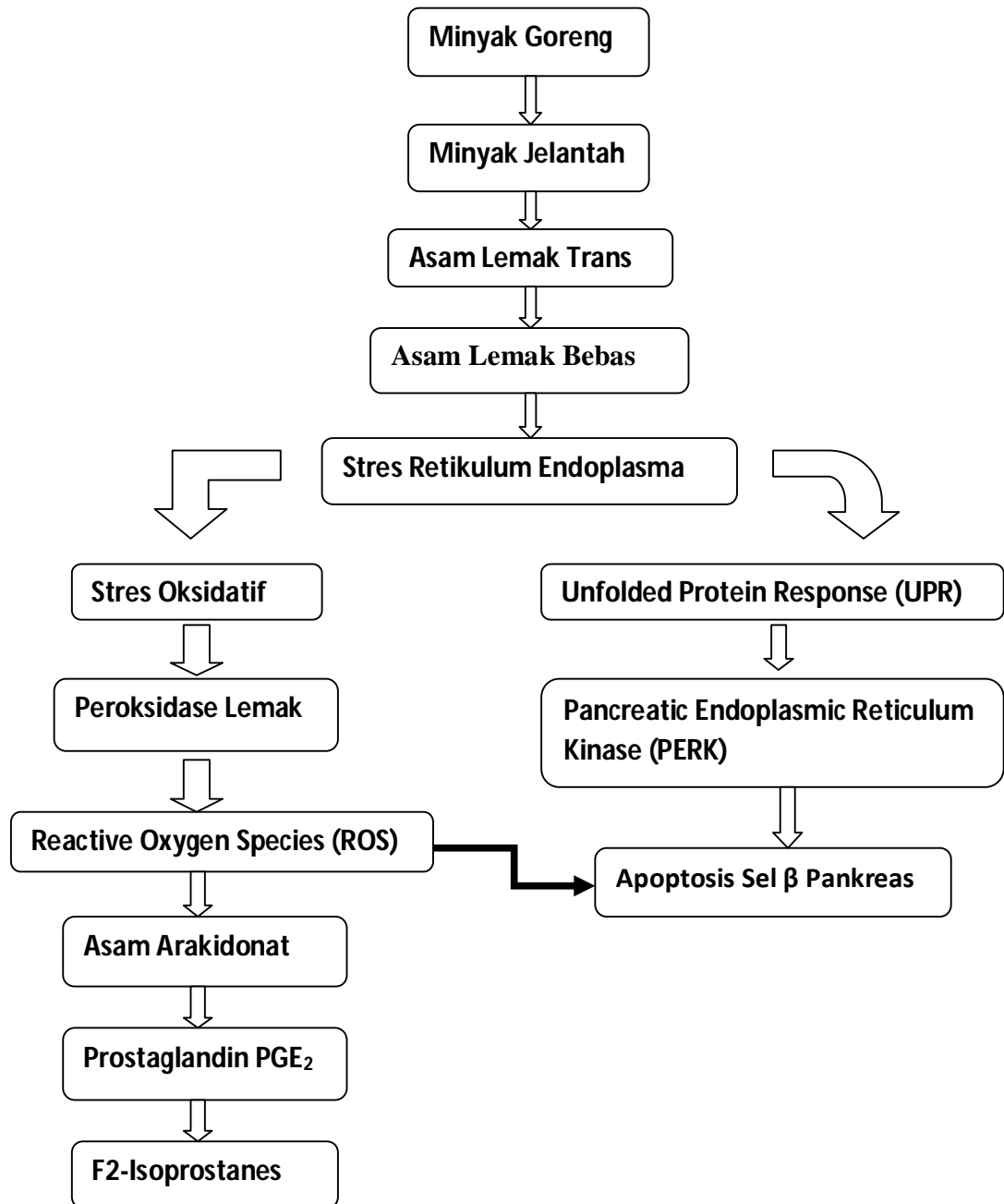
- Sintesa *Nitric Oxide* (NO)⁽⁸⁾
- Supresi faktor antiapoptosis seperti bcl-2, akumulasi trigliserida intraseluler⁽⁹⁾
- Pembentukan *reactive oxygen species* (ROS)⁽¹⁰⁾
- Aktivasi *nuclear factor- κ B*⁽¹¹⁾
- Penurunan sintesa kardiolipin fosfolipid mitokondria⁽¹²⁾
- Sintesa *ceramide*⁽⁹⁾

Penelitian pada tikus 'The Zucker Diabetic Fatty (ZDF)', sebagai model hewan coba diabetes, akumulasi trigliserida yang berlebihan di dalam sel islet menyebabkan apoptosis sel β pankreas melalui sintesa *ceramide de novo* dari palmitoyl-CoA, dan peningkatan NO.⁽⁸⁾

Paparan kronis terhadap asam lemak bebas palmitat menyebabkan gangguan stimulasi glukosa terhadap sekresi insulin (lipotoksisitas). Apoptosis sel β terjadi pada kadar palmitat yang tinggi. Palmitat mempengaruhi metabolisme lemak, fungsi mitokondria, dan faktor transkripsi survival seperti gene Pdx1. Stres retikulum endoplasmik juga terbukti berperan pada lipotoksisitas berbagai sel, termasuk sel β pankreas.⁽⁵⁵⁾

BAB III

KERANGKA KONSEP



BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Desain Penelitian

Desain penelitian adalah penelitian eksperimental pada hewan coba dengan randomisasi dan kontrol.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui hubungan diet minyak jelantah, terhadap ekspresi *F₂-isoprostanes* dan apoptosis sel β pankreas tikus putih (*Rattus novergicus strain wistar*) yang dilihat dari dan jumlah sel β pankreas yang mengalami kerusakan. Sebagai kontrol, adalah pemberian diet normal dan diet atherogenik. Jadi, pada penelitian ini terdapat 3 kelompok perlakuan diet.

Tabel 4.1 Tabel Kelompok Perlakuan dan Pemeriksaan yang Dilakukan

| Kelompok(N=18,n=6) | Perlakuan | Pemeriksaan | |
|--------------------|----------------------|-----------------------------------|--|
| Kelompok 1 | Diet Normal | <i>F₂-isoprostanes</i> | Jumlah sel β pankreas yang rusak |
| Kelompok 2 | Diet Minyak Jelantah | <i>F₂-isoprostanes</i> | Jumlah sel β pankreas yang rusak |
| Kelompok 3 | Diet Atherogenik | <i>F₂-isoprostanes</i> | Jumlah sel β pankreas yang rusak |

4.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Tempat : Laboratorium Farmakologi, Biomedik, dan Faal Fakultas Kedokteran

Universitas Brawijaya Malang

Waktu : Agustus 2008 sampai dengan Desember 2008

4.3 Sampel Penelitian

Sampel penelitian yang digunakan adalah tikus *Rattus novergicus strain wistar* dengan cara pemilihan sesuai dengan kriteria inklusi dan eksklusi. Tikus dikelompokkan menjadi 3 kelompok secara random.

4.4 Jumlah Sampel

Penghitungan besar sampel untuk penelitian analitik komparatif numerik tidak berpasangan lebih dari 2 kelompok adalah dengan rumus:⁽⁵⁶⁾

$$N_1=N_2=N_3= \frac{2(Z_\alpha+Z_\beta)^2 S^2}{(X_1-X_2)^2}$$

Kesalahan tipe I=5%, hipotesis satu arah, $Z_\alpha=1,64$

Kesalahan tipe II=10%, maka $Z_\beta=1,28$

Dari kepustakaan didapatkan simpang baku gabungan (S) = 0,158⁽⁵⁷⁾

Selisih minimal yang dianggap bermakna (X_1-X_2) = 0,5⁽⁵⁷⁾

Besar sampel minimal pada penelitian ini adalah:

$$\begin{aligned} N_1=N_2=N_3 &= \frac{2(Z_\alpha+Z_\beta)^2 S^2}{(X_1-X_2)^2} \\ &= \frac{2(1,64+1,28)^2 (0,158)^2}{(0,5)^2} \\ &= 1,7 \end{aligned}$$

Jadi, besar sampel minimal masing-masing kelompok perlakuan untuk penelitian ini adalah 2 sampel.

4.5 Variabel Penelitian

- Variabel bebas : Diet minyak jelantah, diet atherogenik, dan diet normal.
- Variabel tergantung : Ekspresi *f₂-isoprostanes* dan jumlah kerusakan sel beta pankreas tikus putih.

4.6 Kriteria Inklusi dan Eksklusi

Kriteria Inklusi:

1. Tikus *Rattus novergicus strain wistar* jantan
2. Umur 2 – 3 bulan
3. Berat 120 – 200 gram
4. Tikus Aktif

Kriteria Eksklusi:

1. Tikus yang sakit selama pemberian perlakuan.
2. Tikus yang mati selama pemberian perlakuan.

4.7 Bahan dan Alat

4.7.1 Bahan Makanan Tikus

Pada penelitian yang pernah dilakukan diketahui bahwa kebutuhan makanan tikus dewasa perekor setiap hari adalah 30 gram yang terdiri dari ransum tikus (tepung terigu bromo, pakan ayam *comfeed PARS* dan air). Comfeed PARS mengandung: kadar air 10%, protein kasar 32,5%, lemak kasar 3,5%, serat kasar 8%, abu 35%, kalsium 11-12%, fosfor 1,1-1,5 %.

Pada penelitian ini pemberian makan pada tikus dibedakan menjadi 3 komposisi, yaitu :

Tabel 4.2 Tabel Komposisi Bahan Makanan Hewan Coba

| Bahan Pakan | Diet Normal | Diet Jelantah | Diet atherogenik |
|---------------|-------------|---------------|------------------|
| Comfeed PARS | 225 gram | 200 gram | 200 gram |
| Tepung terigu | 100 gram | 100 gram | 100 gram |
| Kolesterol | | | 8 gram |
| Asam Kolat | | | 0,8 gram |
| Minyak babi | | | 40ml=37,2gram |

| | | | |
|-----------------|--|---|---|
| Minyak jelantah | | 46 gram | |
| | E=1114 Kkal P=53,75gr L=9,9gr KH=202gr Untuk pakan sebesar 30 gr, nilai E=102,8 kkal | E=1442,9Kkal Berat=346gr Untuk mendapat isokalori, berat pakan diberikan sebesar 25,65 gr | E=1442 Kkal Berat=346,04gr Untuk mendapat isokalori, berat pakan diberikan sebesar 24,67 gr |

Pada ketiga perlakuan tersebut mempunyai nilai isokalori yang artinya masing masing jenis pakan tikus mempunyai berat yang berbeda tetapi kandungan energinya hampir sama yaitu $\pm 102,8$ kkal.

4.7.2 Alat

- Alat Pemeliharaan Hewan Coba

Alat pemeliharaan tikus terdiri dari: kandang tikus yang terbuat dari plastik dengan ukuran 50x40x15 cm dengan alas sekam yang bersih dan kering serta diganti dua hari sekali, penutup kandang terbuat dari anyaman kawat, serta terdapat botol air dan tempat pakan tikus.

- Alat Pembuat Makanan Hewan Coba

Baskom plastik, timbangan, pengaduk, *handschoen*, gelas ukur.

- Alat Ukur Glukosa, Kolesterol total, Trigliserida, LDL, dan HDL.

Dengan mesin Cobas Mira (dari Laboratorium Fisiologi FKUB)

- Alat Pembedahan Tikus

Peralatan yang diperlukan untuk pembedahan tikus adalah: *sput*, kapas, tempat organ, dan alat bedah minor.

- Alat Pemeriksaan Patologi Anatomi

Peralatan yang diperlukan untuk pemeriksaan patologi anatomi meliputi: *rotari mikrotom* merek LEICA, mikroskop cahaya merek NIKON

LABOPHOT-2 POL dengan lensa okuler 10x dan lensa obyektif 100x, kaca obyek (*object glass*), dan kaca penutup (*cover glass*).

4.8 Definisi Operasional

1. Diet normal (DN) adalah diet dengan komposisi 225 gram Comfeed Pars dan 100 gram tepung terigu Bromo. Untuk setiap kali makan diberikan ransum sebesar 30 gram yang mengandung energi 102,8 kkal.
2. Diet Minyak jelantah (DMJ) adalah diet dengan komposisi 200 gram Comfeed Pars, 100 gram tepung terigu Bromo, dan 46 gram minyak jelantah. Minyak jelantah pada penelitian ini berasal dari minyak kelapa sawit merk Good Fry yang telah digunakan untuk menggoreng ayam potong pada suhu tinggi $\pm 300^{\circ}\text{C}$ sebanyak lima kali di suatu rumah makan cepat saji di kota Malang.
3. Diet Atherogenik (DA) adalah diet dengan komposisi tinggi lemak dan kolesterol yang diberikan kepada hewan coba (tikus Wistar jantan), yang terdiri dari 200 gram Comfeed Pars, 100 gram tepung terigu Bromo, 8 gram kolesterol, 0,8 gram asam kolat, 40 ml minyak babi. Untuk setiap kali makan, diberikan ransum sebesar 24,67 gram yang mengandung energi 102,8 kkal.
4. Ekspresi *f₂-isoprostan*es dihitung dari jumlah sel β pankreas yang mengekspresikan *f₂-isoprostan*es pada sitoplasmanya dengan metode semikuantitatif. Dilihat dengan mikroskop cahaya merek NIKON LABOPHOT-2 POL pada pembesaran 100x. Ekspresi *f₂-isoprostan*es terlihat sebagai pewarnaan coklat pada sitoplasma sel β pankreas pada pengecatan immunohistokimia.

5. Apoptosis sel β pankreas dihitung dari jumlah sel β pankreas yang mengalami kerusakan berupa ukuran sel yang berkurang atau mengecil dibandingkan dengan sel normal di sekitarnya. Pengamatan dilakukan pada sedian dengan pewarnaan Hematoxilen-Eosin.

4.9 Cara Kerja dan Pengumpulan Data

4.9.1 Cara Pemberian Makanan Pada Tikus

Pakan tikus (baik kelompok perlakuan dan kontrol) diberikan secara oral dalam ransum.

4.9.2 Cara Perlakuan Pada Tikus

- a. Tikus dibagi menjadi 3 kelompok , yaitu:
 1. Diet Normal (DN)
 2. Diet Minyak Jelantah (DMJ)
 3. Diet Atherogenik (DA)
- b. Sebelum perlakuan, tikus diadaptasikan pada kondisi laboratorium selama 7 hari dengan tujuan menyesuaikan dengan lingkungan. Selama adaptasi, semua tikus mendapat diet normal.
- c. Pada awal percobaan, semua tikus ditimbang berat badannya dan dilakukan randomisasi agar setiap hewan coba mendapat peluang yang sama untuk mendapat perlakuan.
- d. Hewan coba diperlakukan pada kandang terpisah (satu kandang untuk satu ekor) . Makanan tikus ditimbang setiap hari. Selisih antara berat sebelum dan sesudah dimakan dinyatakan sebagai intake harian. Intake harian

kemudian dikonversikan ke dalam nilai gizi. Berat badan tikus ditimbang setiap minggu.

- e. Pada akhir minggu ke-8 waktu percobaan, dilakukan pengukuran glukosa, kolesterol total, trigliserida, LDL, dan HDL dengan mesin "Cobas Mira". Juga dilakukan pemeriksaan ekspresi *f₂-isoprostan*es pada sel beta pankreas tikus putih dan jumlah sel β pankreas yang mengalami kerusakan.

4.9.3 Data yang Dikumpulkan

- Intake makanan hewan coba: merupakan berat pakan yang dikonsumsi hewan coba. Selisih antara berat sebelum dan sesudah dimakan dinyatakan sebagai intake harian. Intake harian dikonversikan ke dalam nilai gizi.
- Perubahan berat badan hewan coba: merupakan pengukuran berat badan hewan coba yang dilakukan sekali setiap minggu.
- Pengamatan dan pengukuran ekspresi *f₂-isoprostan*es pada sel beta pankreas tikus.
- Penghitungan jumlah sel β pankreas yang mengalami kerusakan.

4.9.4 Pembuatan Parafin Blok Jaringan Pankreas

Jaringan pankreas dicuci dengan PBS 3-5 x untuk membersihkan dari kontaminan. Kemudian difiksasi pada formalin 10%. Setelah itu dilakukan dehidrasi menggunakan alkohol bertingkat (30%, 50%, 70%, 80%, 96%, dan absolut) masing-masing 60 menit. Dilakukan *Clearing* menggunakan xilol 2 kali masing-masing 60 menit. Kemudian dilakukan infiltrasi dengan parafin lunak selama 60 menit pada suhu 48°C. Kemudian dilakukan *block* dalam parafin keras pada cetakan dan didiamkan selama sehari. Keesokan harinya ditempelkan pada *holder* dan dilakukan

pemotongan setebal 4-6 μm dengan *rotary microtome*. Dilakukan *mounting* pada gelas objek dengan gelatin 5%.

4.9.5 Proses Deparafinisasi

Gelas obyek hasil *parafin block* direndam dalam xilol 2 kali masing-masing selama 5 menit. Setelah itu dilakukan rehidrasi menggunakan alkohol berseri (absolut, 96%, 80%, 70%, 50%, dan 30%) masing-masing selama 5 menit. Kemudian dibilas dalam dH_2O selama 5 menit.

4.9.6 Proses Pewarnaan Hematoxilen-Eosin

Slide dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit. Kemudian diwarnai dengan hematoxilen selama 10 menit. Setelah itu, direndam dalam tap water selama 10 menit. Kemudian dibilas dengan dH_2O . Dilakukan dehidrasi dengan alkohol berseri 30% dan 50% masing-masing selama 5 menit. Kemudian diwarnai dengan larutan eosin selama 3 menit. Setelah itu dibilas dengan alkohol 30%. Dicuci dengan dH_2O selama 5 menit dan dikering anginkan. Kemudian dilakukan *mounting* dengan entelan dan tutup dengan *cover glass*.

4.9.7 Penghitungan Jumlah Ekspresi F2-Isoprostanes dan Sel β Pankreas yang Rusak

1. Terdapat 18 slide, yang terdiri dari 6 slide x 3 kelompok pemeriksaan.
2. Setiap sampel jaringan dibuat sediaan irisan dengan ketebalan 4 μm , kemudian dideteksi:
 - a. Pemeriksaan *Hematoxilen-Eosin*
 - b. Pemeriksaan imunohistokimia *F2-Isoprostane*

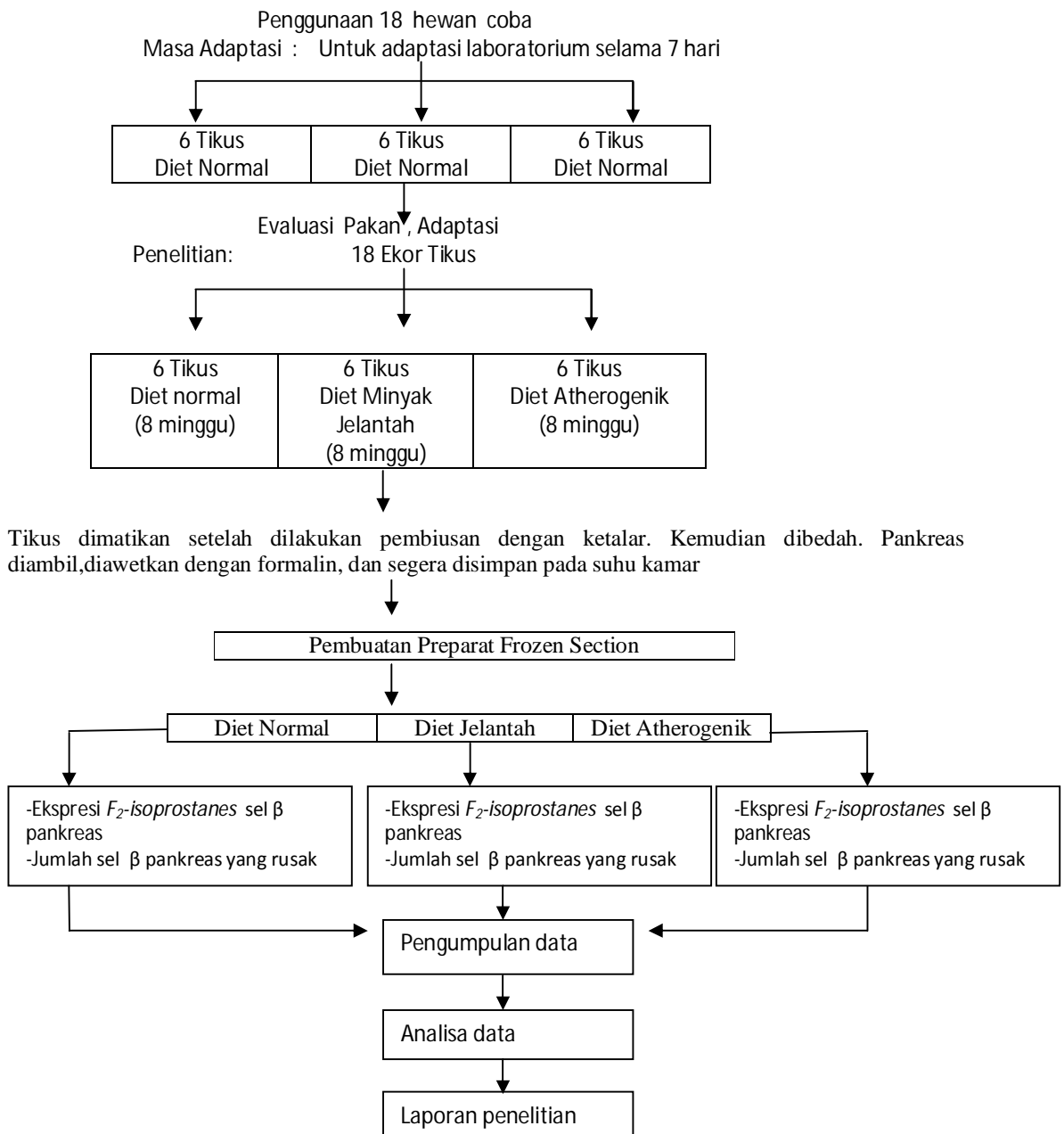
3. Untuk keperluan perhitungan, slide yang sudah berkode ditutup nomer kodenya dan diberi nomer baru secara acak. Sehingga pemeriksa tidak mengetahui slide yang diperiksa merupakan sampel kelompok apa (*Blind*).
4. Pemeriksa terdiri dari 2 orang, masing-masing adalah:
 - a. A
 - b. B
5. Pemeriksaan dan perhitungan sampel dilakukan secara terpisah antara kedua pemeriksa.
6. Pemeriksaan dan perhitungan pankreas untuk mengamati ekspresi *f2-isoprostene* dan apoptosis sel β pankreas. Metode *Hematoxylin-Eosin* dilakukan menurut Soini et al⁽⁵⁸⁾, dan Pizem and Cor⁽⁵⁹⁾ yang dimodifikasi, masing-masing slide pada bidang pandang dengan perbesaran 1000x dan sebanyak 20 lapang pandang.
7. Hasil setiap perhitungan ditulis pada lembar kerja dan diambil nilai rata-rata per lapang pandang
8. Analisis statistik bila semua hasil sudah dikembalikan ke kode sebenarnya .
9. Dalam rangka menjamin representasi dan mengurangi kesalahan hasil, diperlukan pengamatan pada kurang lebih sejumlah 20 lapang pandang dengan perbesaran 1000x yang masing-masing berisi lebih kurang 1500 sel.^(58, 59)

4.9.8 Pengamatan Ekspresi F₂-Isoprostanes

Pengamatan ekspresi *f₂ isoprostanes* pada sitoplasma sel beta pankreas dengan metode imunohistokimia, dimana *F₂ Isoprostanes* ditandai dengan warna coklat pada sitoplasma sel.

Slide dicuci dengan PBS pH 7,4 satu kali selama 5 menit. Bloking endogenous peroksida menggunakan 3% H₂O₂ selama 20 menit. Cuci menggunakan PBS pH 7,4 tiga kali, selam 5 menit. Bloking unspezifik protein menggunakan 5% FBS yang mengandung 0,25% Triton X-100. Cuci menggunakan PBSpH 7,4 tiga kali, selam 5 menit. Inkubasi menggunakan *rabbit poliklonal* anti *F₂ isoprostanes* (LabVision), selama 60 menit. Cuci menggunakan PBSpH 7,4 tiga kali, selam 5 menit. Inkubasi menggunakan anti rabbit HRP conjugated selam 40 menit. Cuci menggunakan PBSpH 7,4 tiga kali, selam 5 menit. Tetesi dengan DAB (*Diamino Benzidine*) dan inkubasi selama 10 menit. Cuci menggunakan PBSpH 7,4 tiga kali, selam 5 menit. Cuci menggunakan dH₂O, selama 5 menit. *Counterstaining* menggunakan Mayer Hematoxilen yang diinkubasi selama 10 menit dan cuci menggunakan tap water. Bilas menggunakan dH₂O dan kering anginkan. *Mounting* menggunakan *entelan* dan tutup dengan *cover glass*. Kemudian diamati pada mikroskop cahaya.

4.10 Kerangka Kerja



4.11 Analisa Hasil Penelitian

Variabel pada penelitian ini terdiri dari variabel bebas (diet minyak jelantah, diet atherogenik, dan diet normal) dan variabel tergantung (ekspresi *f₂-isoprostanes* pada sel beta pankreas dan jumlah sel β pankreas yang rusak), yang masing-masing merupakan variabel numerik.

Analisa statistik pada penelitian ini menggunakan program SPSS 13.0 untuk *windows XP*. Jika persyaratan uji parametrik terpenuhi, maka dilakukan uji analisa dengan *One Way Analysis of Variance (Anova)*. Jika persyaratan uji parametrik tidak terpenuhi, maka akan dilakukan uji *kruskal-wallis*.

Pada penelitian ini, *level of significancy (α)* adalah sebesar 95 %, sedangkan *degree of uncertainty* yang digunakan adalah $p < 0,05$. Hasil uji analisa dianggap bermakna bila $p < 0,05$.

BAB V

HASIL PENELITIAN

Hewan coba pada penelitian ini dibagi dalam tiga kelompok perlakuan yang dibedakan berdasarkan jenis diet yang diberikan, yaitu diet minyak jelantah, diet normal, dan diet atherogenik. Berat badan masing-masing hewan coba ditimbang setiap minggu dan dilakukan monitor sisa pakan setiap hari. Pada akhir perlakuan didapatkan data dari 18 ekor tikus *Rattus novergicus strain wistar* berupa data berat badan awal, berat badan akhir, pertambahan berat badan, data asupan kalori, ekspresi *f2-isoprostanes*, dan jumlah kerusakan sel β pankreas sebagai gambaran apoptosis sel β pankreas. Semua data tersebut ditampilkan dalam tabel.

5.1 Berat badan awal, berat badan akhir, peningkatan berat badan, dan asupan kalori berdasarkan tiga jenis diet (Diet normal, diet minyak jelantah, dan diet atherogenik)

Selama penelitian, ketiga kelompok hewan coba diberi diet isokalori. Asupan kalori dihitung dari selisih jumlah pakan yang diberikan dengan sisa pakan. Penimbangan berat badan tikus dilakukan setiap tujuh hari sekali sehingga dapat diketahui perkembangan berat badan secara bertahap. Berat badan awal adalah berat badan tikus setelah menjalani 7 hari masa adaptasi dengan diet normal. Berat badan akhir adalah berat badan setelah berakhirnya masa perlakuan selama delapan minggu. Peningkatan berat badan diketahui dengan menghitung selisih berat badan akhir dan berat badan awal penelitian. Data yang didapat, terangkum dalam tabel berikut ini.

Tabel 5.1 Berat Badan Awal, Berat Badan Akhir, Peningkatan Berat Badan, dan Asupan Kalori berdasarkan tiga jenis diet (Diet normal, diet minyak jelantah, dan diet atherogenik).

| | Diet Normal | Diet Minyak Jelantah | Diet Atherogenik | p |
|---------------------------|--------------------|----------------------|--------------------|--------|
| BB Awal (gram) | 186,95±24,56 | 177,63±31,21 | 208,85±16,18 | 0,107 |
| BB Akhir (gram) | 266,12±27,45 | 234,78±43,31 | 293,53±35,89 | 0,409 |
| Peningkatan BB (gram) | 79,17±7,95 | 57,15±14,99 | 84,68±32,88 | 0,055 |
| Asupan Kalori (kkal/hari) | 57,78(46,26-60,81) | 43,53(39,67-60,72) | 65,46(61,43-74,59) | 0,002* |

*Nilai p yang bermakna ($p < 0,05$)

Pada tabel 5.1 dapat dilihat bahwa rerata berat badan awal hewan coba yang mendapat diet minyak jelantah secara uji statistik tidak berbeda bermakna dengan kelompok kontrol yaitu kelompok diet normal dan diet atherogenik ($p=0,107$). Rerata berat badan awal hewan coba yang mendapat diet minyak jelantah ternyata paling kecil bila dibandingkan dengan kelompok yang mendapat diet normal dan diet atherogenik ($177,63 \pm 31,21$ vs $186,95 \pm 24,56$; $177,63 \pm 31,21$ vs $208,85 \pm 16,18$).

Setelah delapan minggu perlakuan, ternyata rerata berat badan akhir juga pada ketiga kelompok hewan coba juga tidak berbeda bermakna ($p=0,409$). Rerata berat badan akhir hewan coba yang mendapat diet minyak jelantah tetap paling kecil dibandingkan diet normal ataupun diet atherogenik ($234,78 \pm 43,31$ vs $266,12 \pm 27,45$; $234,78 \pm 43,31$ vs $293,53 \pm 35,89$).

Demikian pula uji statistik terhadap peningkatan berat badan selama masa penelitian tidak menunjukkan perbedaan yang bermakna pada semua kelompok hewan coba ($p=0,055$). Rerata peningkatan berat badan yang paling sedikit adalah pada kelompok yang mendapat diet minyak jelantah bila dibandingkan dengan

kelompok yang mendapat diet normal ataupun diet atherogenik ($57,15 \pm 14,99$ vs $79,17 \pm 7,95$; $57,15 \pm 14,99$ vs $84,68 \pm 32,88$).

Data rerata asupan kalori pada kelompok hewan coba yang mendapat diet minyak jelantah juga lebih sedikit bila dibandingkan dengan kelompok hewan coba yang mendapat diet normal ataupun diet atherogenik [$43,53(39,67-60,72)$ vs $57,78(46,26-60,81)$; $43,53(39,67-60,72)$ vs $65,46(61,43-74,59)$]. Uji statistik menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna rerata asupan kalori pada ketiga kelompok diet ($p=0,002$).

5.2 Ekspresi F2-isoprostanes dan apoptosis sel β pankreas berdasarkan tiga jenis diet (Diet normal, diet minyak jelantah, dan diet atherogenik)

Ekspresi f_2 isoprostanes pada sitoplasma sel β pankreas diperiksa dengan metode imunohistokimia, dimana f_2 -isoprostanes ditandai dengan timbulnya warna coklat pada sitoplasma sel. Apoptosis sel β pankreas dilihat dari jumlah sel β pankreas yang mengalami kerusakan berupa ukuran sel yang berkurang atau mengecil (*shrinkage*) dibandingkan dengan sel normal di sekitarnya pada sediaan dengan pewarnaan Hematoxilen-Eosin. Penghitungan ekspresi f_2 -isoprostanes dan apoptosis sel β pankreas dilakukan pada 20 lapang pandang dengan perbesaran 1000x lalu dihitung nilai rata-ratanya (jumlah sel per lapangan pandang).

Tabel 5.2 Ekspresi F_2 -isoprostanes dan apoptosis sel β pankreas berdasarkan tiga jenis diet (Diet normal, diet minyak jelantah, dan diet atherogenik).

| | Diet Normal | Diet Minyak Jelantah | Diet Atherogenik | p |
|--|-----------------|----------------------|------------------|--------|
| F2-isoprostanes[#] (sel/lap.pandang) | 3(3-9) | 33,00(28-39) | 36(26-42) | 0,003* |
| Apoptosis Sel β^s (sel/lap.pandang) | 2,33 \pm 1,21 | 13,00 \pm 3,35 | 12,83 \pm 2,79 | 0,000* |

*Nilai p yang bermakna ($p < 0,05$)

#Rerata *F2-isoprostanes* = median(minimum-maksimum); karena data tidak homogen.

\$Rerata Apoptosis sel β pankreas = mean \pm SD; karena data homogen.

Pada tabel 5.2 dapat dilihat bahwa rerata ekspresi *f2-isoprostanes* pada kelompok hewan coba yang mendapat diet minyak jelantah lebih besar daripada kelompok diet normal [33,00(28-39) vs 3(3-9)], tetapi lebih kecil daripada kelompok diet atherogenik [33,00(28-39) vs 36(26-42)]. Hasil uji statistik menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna tentang rerata ekspresi *f2-isoprostanes* pada kelompok hewan coba yang mendapat diet minyak jelantah dibandingkan dengan kelompok yang mendapat diet normal ataupun diet atherogenik ($p=0,003$).

Apoptosis sel β pankreas yang pada penelitian ini dilihat dari jumlah kerusakan (*shrinkage*) sel β pankreas ternyata reratanya paling banyak pada kelompok hewan coba yang mendapat diet minyak jelantah bila dibandingkan dengan diet atherogenik dan diet normal ($13,00 \pm 3,35$ vs $12,83 \pm 2,79$ vs $2,33 \pm 1,21$). Perbedaan ini bermakna secara statistik dengan nilai $p=0,000$.

Tabel 5.3 Perbedaan Rerata Ekspresi *F2-Isoprostanes*.

| | Diet Normal | Diet Minyak Jelantah | Diet Atherogenik | p |
|--|-------------|----------------------|------------------|--------|
| Rerata[median(min-maks)] ekspresi <i>F2-Isoprostanes</i> (sel/lap.pandang) | 3 (3-9) | 33 (28-39) | - | 0,002* |
| | 3 (3-9) | - | 36 (26-42) | 0,002* |
| | - | 33 (28-39) | 36 (26-42) | 0,485 |

*Nilai p yang bermakna ($p < 0,05$). Menggunakan analisa statistik Kruskal-wallis dan uji post-hoc Mann-Whitney.

Uji statistik juga dilakukan antar kelompok diet. Pada tabel 5.3 dapat dilihat bahwa rerata ekspresi *f2-isoprostanes* pada kelompok diet minyak jelantah yang lebih

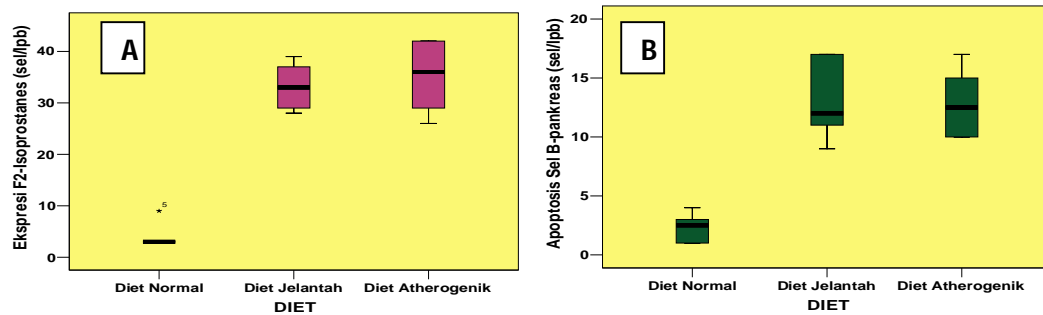
besar dibandingkan dengan kelompok diet normal, berbeda bermakna secara statistik ($p=0,002$). Demikian pula dengan rerata ekspresi f_2 -isoprostanes pada kelompok diet atherogenik juga lebih besar dan berbeda bermakna secara statistik bila dibandingkan dengan kelompok diet normal ($p=0,002$). Sedangkan rerata ekspresi f_2 -isoprostanes pada kelompok diet atherogenik meskipun lebih besar daripada kelompok diet minyak jelantah, ternyata perbedaan ini tidak bermakna secara statistik ($p=0,485$).

Tabel 5.4 Perbedaan Rerata Apoptosis Sel β Pankreas.

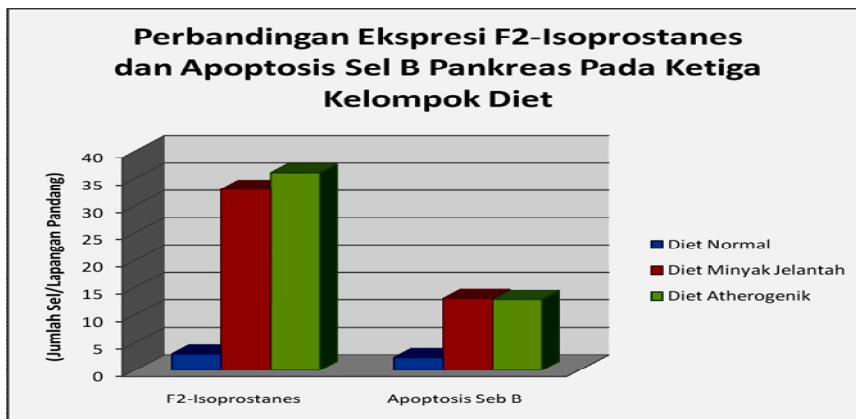
| | Diet Normal | Diet Minyak Jelantah | Diet Atherogenik | p |
|---|-----------------|----------------------|------------------|--------|
| Rerata (mean \pm SD) apoptosis Sel β Pankreas (sel/lap.pandang) | 2,33 \pm 1,21 | 13,00 \pm 3,35 | - | 0,000* |
| | 2,33 \pm 1,21 | - | 12,83 \pm 2,79 | 0,000* |
| | - | 13,00 \pm 3,35 | 12,83 \pm 2,79 | 0,949 |

*Nilai p yang bermakna ($<0,05$). Menggunakan analisa parametrik Anova dan uji post-hoc Tuckey.

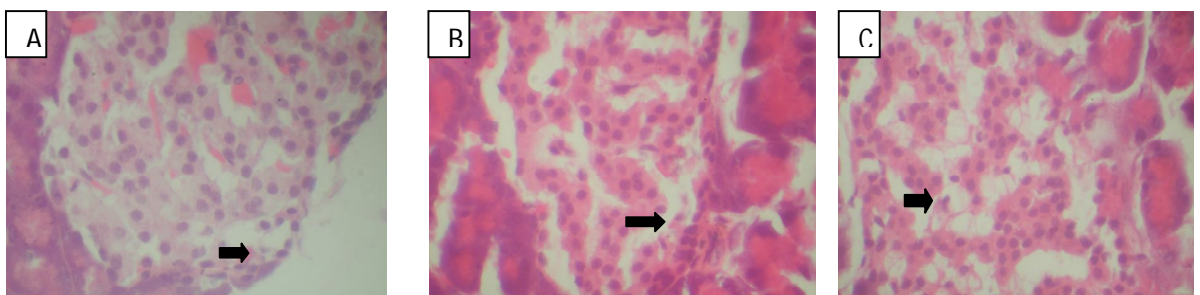
Tabel 5.4 menunjukkan bahwa rerata apoptosis Sel β pankreas pada kelompok diet minyak jelantah lebih besar dibandingkan dengan kelompok diet normal, dan berbeda bermakna secara statistik ($p=0,000$). Demikian pula dengan rerata apoptosis Sel β pankreas pada kelompok diet atherogenik juga lebih besar dan berbeda bermakna secara statistik bila dibandingkan dengan kelompok diet normal ($p=0,000$). Sedangkan rerata apoptosis Sel β pankreas pada kelompok diet minyak jelantah meskipun lebih besar daripada kelompok diet atherogenik, ternyata perbedaan ini tidak bermakna secara statistik ($p=0,949$).



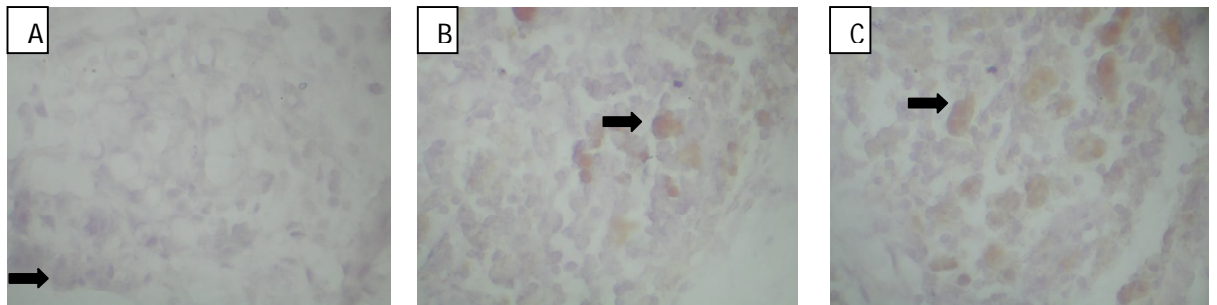
Gambar 5.1 Grafik perbandingan ekspresi *f2-isoprostanes* dan apoptosis sel β pankreas pada kelompok diet normal, diet minyak jelantah, dan diet atherogenik. Gambar A: grafik boxplot ekspresi *f2-isoprostanes*. Gambar B: grafik boxplot apoptosis sel β pankreas.



Gambar 5.2 Diagram batang perbandingan ekspresi *f2-isoprostanes* dan apoptosis sel β pankreas pada kelompok diet normal, diet minyak jelantah, dan diet atherogenik. (satuan: jumlah sel per lapangan pandang, dengan pembesaran 1000x)



Gambar 5.3 Pewarnaan HE untuk mengamati sel β pankreas pada tikus wistar yang diberi diet normal(A), diet minyak jelantah (B), dan diet atherogenik (C). Apoptosis sel β pankreas dinilai dari sel β yang mengalami pengerutan (shrinkage).



Gambar 5.4 Pemeriksaan imunohistokimia untuk mengamati ekspresi f2-isoprostanes (nampak sebagai warna coklat) pada tikus yang diberi diet normal (A), diet minyak jelantah (B), dan diet atherogenik (C).

BAB VI

PEMBAHASAN

Minyak jelantah merupakan minyak goreng yang telah dipakai menggoreng beberapa kali pada suhu tinggi. Berdasarkan kandungan total bahan-bahan polar yang dihasilkan dari proses penggorengan tersebut, dapat diketahui bahwa pada suatu penelitian yang pernah dilakukan, ternyata minyak goreng masih aman bila dipakai menggoreng sebanyak tiga kali.^(18, 21) Total kandungan bahan-bahan polarnya akan melewati batas yang aman untuk kesehatan bila dipakai menggoreng lebih dari tiga kali. Pada penelitian ini dipakai minyak jelantah dari minyak goreng kelapa sawit yang sudah dipakai menggoreng pada suhu tinggi sebanyak lima kali, sehingga diharapkan dapat diketahui apakah efek negatifnya terhadap kesehatan, khususnya terhadap sel β pankreas.

Hasil pengamatan pada penelitian ini tentang berat badan awal, berat badan akhir, dan peningkatan berat badan pada ketiga kelompok diet ternyata tidak berbeda bermakna ($p=0,107$; $p=0,409$; $p=0,055$). Rerata berat badan awal hewan coba dari ketiga kelompok diet tidak berbeda sehingga terdapat homogenitas pada ketiga kelompok diet di awal penelitian.

Dari data intake harian, dapat diketahui asupan kalori tiap hewan coba. Pada penelitian ini setiap hewan coba diberi diet isokalori dengan jumlah 102,8 kalori/hari yang disediakan dalam jumlah ± 30 gram/hari untuk tiap hewan coba. Ini ditentukan berdasarkan kemampuan seekor tikus wistar dalam mengkonsumsi pakan sebesar 20-30 gram per hari.⁽⁶⁰⁾ Hasil analisa menunjukkan perbedaan mengenai asupan makanan

di antara ketiga kelompok diet ($p=0,002$). Asupan kalori berbeda pada kelompok diet atherogenik dan diet normal ($p=0,02$) serta diet atherogenik dan diet minyak jelantah ($p=0,002$). Sedangkan asupan kalori diet normal dan diet minyak jelantah tidak berbeda ($p=0,24$). Asupan kalori pada hewan coba yang mendapat diet minyak jelantah ternyata paling sedikit. Hal ini disebabkan penambahan minyak jelantah yang banyak mengandung asam lemak *trans* yang mempunyai rantai karbon yang panjang akan mudah mengalami oksidasi lemak sehingga menimbulkan perubahan rasa makanan menjadi "tengik" sehingga tidak terlalu disukai oleh tikus. Oksidasi lemak disebutkan akan menyebabkan kerusakan bahan makanan, salah satunya adalah perubahan pada rasa dan aroma bahan makanan menjadi tidak enak lagi.⁽⁶¹⁾ Meskipun asupan kalori lebih sedikit, tetapi bisa menyebabkan penambahan berat badan hewan coba yang mendapat diet minyak jelantah menjadi sebanding dengan diet atherogenik. Penelitian lain pada monyet membuktikan bahwa diet tinggi asam lemak *trans* menyebabkan peningkatan berat badan yang bermakna dibandingkan dengan diet asam lemak tak jenuh tunggal.⁽⁶²⁾

Proses hidrogenasi parsial, oksidasi, dan paparan dengan suhu tinggi selama proses menggoreng akan menurunkan kualitas minyak goreng. Asam lemak tak jenuh yang terdapat di dalam minyak kelapa sawit akan mengalami perubahan dari bentuk *cis* menjadi bentuk isomer *trans*. Perubahan *cis* menjadi *trans* mulai terjadi pada temperatur 180°C dan meningkat sebanding dengan kenaikan temperatur.⁽⁶³⁾ Asam lemak *trans* inilah yang pada berbagai penelitian terdahulu terbukti memberikan efek negatif, bahkan dianggap lebih berbahaya dari pada asam lemak jenuh. Karena selain

sama-sama meningkatkan kadar LDL, asam lemak *trans* juga terbukti menurunkan kadar HDL dan peningkatan lipoprotein(a) yang bersifat atherogenik. Berbeda dengan asam lemak jenuh, asam lemak *trans* menghambat aktifitas *lecithin cholesterolacyl transferase* (LCAT) sehingga menurunkan kadar HDL.⁽⁶³⁾ Penelitian ini memang memiliki kelemahan karena tidak dilakukan analisa terhadap kadar asam lemak *trans* yang terkandung di dalam minyak jelantah yang digunakan, karena keterbatasan biaya.

Penelitian ini menunjukkan peningkatan yang bermakna dari ekspresi f_2 *isoprostanes* pada kelompok tikus yang diberi diet minyak jelantah ataupun kelompok yang mendapatkan diet atherogenik, bila masing-masing dibandingkan dengan diet normal [33,00(28-39) vs 3(3-9), $p=0,002$; 36(26-42) vs 3(3-9), $p=0,002$]. Sedangkan bila dibandingkan antara diet minyak jelantah dan diet atherogenik, ternyata sama-sama mengalami peningkatan yang tidak berbeda bermakna [33,00(28-39) vs 36(26-42), $p=0,485$]. Ini berarti terjadinya peningkatan ekspresi f_2 *isoprostanes* pada kelompok yang diberi diet minyak jelantah sebanding dengan diet atherogenik. Hipotesa penelitian ini tentang lebih tingginya ekspresi f_2 *isoprostanes* sel β pankreas pada pemberian diet minyak jelantah ataupun diet atherogenik dibandingkan dengan diet normal, telah terbukti. Sedangkan hipotesa bahwa ekspresi f_2 *isoprostanes* sel β pankreas pada pemberian diet minyak jelantah lebih rendah daripada diet atherogenik, ternyata tidak terbukti.

Pemberian diet minyak jelantah yang banyak mengandung asam lemak *trans* menyebabkan stres oksidatif di mitokondria dengan akibat peningkatan produk-

produk *reactive oxygen species* (ROS). Reaksi peroksidase lemak inilah yang diukur secara tidak langsung melalui ekspresi *f2-isoprostanes* pada sitoplasma sel β pankreas tikus Wistar. Terbukti pada penelitian ini bahwa pemberian diet minyak jelantah meningkatkan stres oksidatif, sebanding dengan diet atherogenik.

Pada penelitian ini juga bertujuan untuk meneliti pengaruh pemberian diet minyak jelantah terhadap apoptosis sel β pankreas yang dapat dikenali pada tahap awal dengan adanya perubahan bentuk sel menjadi lebih kecil (*shrinkage*), kondensasi, dan fragmentasi kromatin.⁽⁶⁴⁾ Hal ini berhubungan dengan pecahnya DNA di regio internukleosomal pada isolasi DNA dengan elektroforesis yang nampak sebagai gambaran anak tangga (*ladder pattern*). Gambaran lain tentang apoptosis adalah kolaps struktur sitoskeletal, fragmentasi nuklear, dan keluarnya isi sel. Pada penelitian ini kerusakan sel β pankreas dilihat dari ukuran sel yang menjadi lebih kecil bila dibandingkan dengan sel normal di sekitarnya. Sebenarnya pewarnaan HE tidak dapat membedakan antara apoptosis dan nekrosis sel. Perlu pengecatan khusus seperti Tunnel untuk melihat gambaran fragmentasi DNA.⁽⁴⁸⁾

Hasil yang didapatkan adalah peningkatan yang bermakna tentang jumlah sel β pankreas yang rusak (*shrinkage*) pada tikus yang mendapat diet minyak jelantah ataupun diet atherogenik dibandingkan dengan diet normal [$13,00 \pm 3,35$ vs $2,33 \pm 1,21$, $p=0,000$; $12,83 \pm 2,79$ vs $2,33 \pm 1,21$, $p=0,000$]. Sedangkan antara diet minyak jelantah dan diet atherogenik, meskipun sama-sama meningkat, ternyata tidak ada perbedaan yang bermakna [$13,00 \pm 3,35$ vs $12,83 \pm 2,79$, $p=0,949$].

Hasil penelitian ini sesuai dengan literatur yang menyebutkan bahwa paparan kronis asam lemak bebas dapat menyebabkan apoptosis sel β pankreas melalui aktivasi jalur *caspase*.⁽⁶⁵⁾ Penelitian oleh Poitout dan Robertson juga membuktikan bahwa oksidasi asam lemak yang berlebihan dan kronis akan menyebabkan kematian (apoptosis) sel β pankreas.⁽⁶⁶⁾ Apoptosis sel β pankreas akan berakibat pada terjadinya diabetes mellitus. Penelitian oleh *The Nurses' Health Study* terhadap 84.000 wanita membuktikan bahwa diet tinggi asam lemak *trans* berkaitan dengan peningkatan kejadian diabetes mellitus tipe 2.⁽⁵⁾

Hipotesa penelitian ini tentang lebih tingginya apoptosis sel β pankreas pada pemberian diet minyak jelantah ataupun diet atherogenik dibandingkan dengan diet normal juga terbukti. Sedangkan hipotesa bahwa apoptosis sel β pankreas pada pemberian diet minyak jelantah lebih rendah daripada diet atherogenik ternyata tidak terbukti.

Secara keseluruhan dapat dilihat bahwa meskipun asupan kalori dan penambahan berat badan pada kelompok hewan coba yang mendapat diet minyak jelantah lebih sedikit dari pada hewan coba yang mendapatkan diet atherogenik, ternyata efek negatif yang ditimbulkan lebih besar. Asupan kalori yang lebih kecil dari diet minyak jelantah ternyata menimbulkan kerusakan sel β pankreas dalam jumlah yang lebih banyak. Asupan kalori pada kelompok diet minyak jelantah yang tidak berbeda dengan kelompok diet normal ($p=0,24$) ternyata lebih besar efek negatifnya terhadap oksidasi lemak dan apoptosis sel β pankreas.

Pada penelitian kami, diet atherogenik dan diet minyak jelantah tidak menyebabkan obesitas pada tikus, meskipun terjadi peningkatan stres oksidasi dan apoptosis sel β pankreas. Sebenarnya hasil ini tidak sesuai dengan hasil penelitian yang dilakukan oleh Ozcan dkk yang menyebutkan bahwa obesitas berbanding lurus dengan stres retikulum endoplasma, resistensi insulin, dan diabetes mellitus.⁽⁶⁷⁾

Beberapa kelemahan yang terdapat pada penelitian ini adalah tidak dilakukannya analisa tentang komposisi masing-masing jenis asam lemak *trans*, asam lemak jenuh, ataupun asam lemak tak jenuh yang terkandung dalam tiap bahan pakan. Ekspresi f2-isoprostanes diamati dengan pewarnaan imunohistokimia menggunakan antibodi poliklonal sebenarnya juga memiliki kelemahan karena bersifat kurang spesifik. Pengamatan terhadap apoptosis sel β pankreas juga lebih tepat bila menggunakan pewarnaan khusus (Tunnel) yang dapat memperlihatkan fragmentasi DNA. Selain itu, efek toksik minyak jelantah seharusnya juga ditentukan dengan pengukuran kadar *total polar material* (TPM) untuk mengetahui besarnya kandungan senyawa *volatile* dan *non-volatile* yang berperan sebagai radikal bebas. Hal ini membuka kesempatan untuk dilakukannya penelitian lebih lanjut supaya lebih dapat mempelajari dan mengetahui secara terperinci mengenai hubungan pemberian diet minyak jelantah terhadap kerusakan sel β pankreas.

BAB VII

SIMPULAN DAN SARAN

7.1 Simpulan

Penelitian ini memberikan hasil yang dapat membuktikan hipotesa penelitian, yaitu:

- Ekspresi *f2-isoprostanes* pada sel β pankreas tikus putih (*rattus novergicus Strain Wistar*) yang mendapat diet minyak jelantah lebih tinggi dibandingkan dengan diet normal.
- Ekspresi *f2-isoprostanes* pada sel β pankreas tikus putih (*rattus novergicus Strain Wistar*) yang mendapat diet normal lebih rendah dibandingkan dengan diet atherogenik.
- Jumlah kerusakan sel β pankreas tikus putih (*rattus novergicus Strain Wistar*) yang mendapat diet minyak jelantah lebih banyak dibandingkan dengan diet normal
- Jumlah kerusakan sel β pankreas tikus putih (*rattus novergicus Strain Wistar*) yang mendapat diet normal lebih sedikit dibandingkan dengan diet atherogenik.

Hipotesa penelitian yang tidak terbukti adalah:

- Ekspresi *f2-isoprostanes* dan jumlah kerusakan sel β pankreas tikus putih (*rattus novergicus Strain Wistar*) yang mendapat diet minyak jelantah ternyata sebanding dengan diet atherogenik.

Ekspresi *f2-isoprostanes* sebagai marker peroksidase lemak tak langsung dan apoptosis sel β pankreas yang dinilai dengan jumlah sel β yang mengalami kerusakan (*shrinkage*) pada penelitian ini ternyata menunjukkan peningkatan yang bermakna pada kelompok tikus wistar yang diberi diet minyak jelantah ataupun diet atherogenik, bila dibandingkan dengan kelompok diet normal. Peningkatan tersebut bila dibandingkan di antara kelompok diet minyak jelantah dan diet atherogenik sendiri, ternyata tidak berbeda bermakna. Sehingga dapat disimpulkan bahwa diet minyak jelantah berpengaruh terhadap peningkatan ekspresi *f2-isoprostanes* dan apoptosis sel β pankreas. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui korelasi antara peningkatan ekspresi *f2-isoprostanes* dan apoptosis sel β pankreas tersebut.

7.2 Saran

Penelitian ini merupakan penelitian awal yang masih memerlukan pengembangan lebih lanjut. Pada penelitian ini masih terdapat banyak kelemahan seperti yang telah dikemukakan dalam pembahasan sehingga perlu dilakukan perbaikan pada penelitian selanjutnya yaitu:

- a. Penelitian lanjutan dengan komposisi tiap jenis asam lemak secara lebih terperinci untuk masing-masing kelompok diet.
- b. Pemakaian sampel yang lebih banyak dan waktu perlakuan yang lebih lama untuk menilai efek diet minyak jelantah terhadap kerusakan sel β pankreas.

- c. Penelitian dengan berbagai macam minyak jelantah yang dibedakan berdasarkan jumlah pemakaian minyak untuk beberapa kali penggorengan sehingga dapat lebih diketahui batasan yang aman tentang berapa kali pemakaian minyak untuk menggoreng.
- d. Pengukuran efek toksik minyak jelantah dengan mengukur kadar *total polar material* (TPM).
- e. Pemeriksaan apoptosis sel β pankreas dengan pewarnaan yang lebih spesifik untuk melihat fragmentasi DNA.
- f. Saran kepada masyarakat supaya tidak menggunakan minyak jelantah karena efek toksiknya sangat merugikan kesehatan, terutama terhadap kerusakan sel β pankreas.

DAFTAR PUSTAKA

1. Ferranti Sd, Mozaffarian D. The Perfect Storm: Obesity, Adipocyte Dysfunction, and Metabolic Consequences. *Clinical Chemistry* 2008;54:1-12.
2. Eckel RH, Borra S, Lichtenstein AH, Yin-Piazza SY. Understanding the Complexity of Trans Fatty Acid Reduction in the American Diet: American Heart Association Trans Fat Conference 2006: Report of the Trans Fat Conference Planning Group. *Circulation*. 2007;115:2231-46.
3. Lichtenstein AH, Ausman LM, Jalbert SM, Schaefer EJ. Effects of different forms of dietary hydrogenated fats on serum lipoprotein cholesterol levels. *N Engl J Med*. 1999;340:1933–40.
4. Mozaffarian D, Katan MB, Ascherio A, Stampfer MJ, Willett WC. Trans fatty acids and cardiovascular disease. *N Engl J Med*. 2006;354:1601–13
5. Salmerón J, Hu FB, Manson JE, Stampfer MJ, Colditz GA, Rimm EB, et al. Dietary fat intake and risk of type 2 diabetes in women. *Am J Clin Nutr*. 2001;73:1019 –26.
6. Dobbins RL, Szczepaniak LS, Myhill J, Tamura Y, Uchino H, Giacca A, et al. The composition of dietary fat directly influences glucosestimulated insulin secretion in rats. *Diabetes*. 2002;51:1825–33.
7. Maedler K, Spinas GA, Dyntar D, Moritz W, Kaiser N, Donath MY. Distinct effects of saturated and monounsaturated fatty acids on β -cell turnover and function. *Diabetes*. 2001;50:69 –76.

8. Shimabukuro M, Zhou YT, Levi M, Unger RH. Fatty acid-induced β cell apoptosis: a link between obesity and diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95:2498–502.
9. Lupi R, Dotta F, Marselli L, Del-Guerra S, Masini M, Santangelo C, et al. Prolonged exposure to free fatty acids has cytostatic and pro-apoptotic effects on human pancreatic islets: evidence that β -cell death is caspase mediated, partially dependent on ceramide pathway, and Bcl-2 regulated. *Diabetes*. 2002;51:1437–42.
10. Listenberger LL, Ory DS, Schaffer JE. Palmitate-induced apoptosis can occur through a ceramide-independent pathway. *J Biol Chem*. 2001;276:14890–5.
11. Rakatzi I, Mueller H, Ritzeler O, Tennagels N, Eckel J. Adiponectin counteracts cytokine- and fatty acid-induced apoptosis in the pancreatic beta-cell line INS-1. *Diabetologia*. 2004;47:249–58.
12. Hardy S, El-Assaad W, Przybytkowski E, Joly E, Prentki M, Langelier Y. Saturated fatty acid-induced apoptosis in MDA-MB-231 breast cancer cells: a role for cardiolipin. *J Biol Chem* 2003;278:31861–70.
13. Montuschi P, Barnes PJ, Roberts LJ. Isoprostanes: Markers and Mediators of Oxidative Stress. *The FASEB Journal*. 2004;18:1791-800.
14. Roberts LJ, Morrow JD. Measurement of F2-isoprostanes as an Index of Oxidative Stress in Vivo. *Free Radic Biol Med*. 2000;28:505-13.
15. Minyak [database on the Internet]. 2006 [cited Juni 27th 2007]. Available from: [Http://id.wikipedia.org/wiki/minyak](http://id.wikipedia.org/wiki/minyak).

16. Minyak Goreng [database on the Internet]. NTUST Indonesian Student Association. 2008 [cited 1 March, 2008]. Available from: <http://www.ntust-isa.org>.
17. Cooking oil [database on the Internet]. 2008 [cited November 18th 2008]. Available from: <Http://wikipedia/encyclopedia.mht>.
18. Sawitri B. Daur ulang minyak goreng bekas. Gema Industri Kecil. 2008:50-2.
19. Tips Memilih Minyak Goreng [database on the Internet]. 2008 [cited March 13rd, 2008]. Available from: <http://www.halalguide.info/2008/11/08>.
20. Minyak Jelantah, Amankah? [database on the Internet]. 2007 [cited March 2007]. Available from: <http://www.halalguide.info/content/view/743/38>
21. Andrikopoulos NK. Oxidative stressed frying fats and oilsPotential role for health. Int J Food Sci Technol. 2002;37:177-90.
22. Dobarganes MC, Marquez-Ruiz G. Formation and analysis of oxidized monomeric, dimeric and higher oligomeric triglycerides. In: Erickson MD, editor. Deep Frying; Chemistry, Nutrition and Practical Applications. Urbana: AOCS Press; 2006. p. 87-110.
23. Hamilton, Hamm. Edible Oil Processing. Sheffield-England: Sheffield Academic Press; 2000.
24. Denke M. Serum lipid concentrations in humans. In: Trans fatty acids and coronary heart disease risk: report of the expert panel on trans fatty acids and coronary heart disease. American Journal of Clinical Nutrition. 1995;62:693S-700S.

25. Nawar WW. Lipids In: Fennema OR, editor. Food Chemistry. 3 ed. New York, USA: Marcel Dekker, Inc; 1996. p. 225-319.
26. Quaglia GB, Bucarelli FM. Effective process control in frying. In: Rossell JB, editor. Frying –Improving Quality. Cambridge, England: Woodhead Publishing; 2001. p. 236-65.
27. Perkins EG. Volatile odor and flavor components formed in deep frying. In: Erickson MD, editor. Deep Frying; Chemistry, Nutrition and Practical Applications. Urbana: AOCS Press; 2006. p. 51-6.
28. Loi C, Chardigny J, Cordelet C, Leclere L, Genty M, Ginies C. Incorporation and metabolism of trans 20:5 in endothelial cells. Effect on prostacyclin synthesis. Lipids. 2000;35:911-8.
29. Simopoulos A. Essential fatty acids in health and chronic disease. American Journal of Clinical Nutrition. 1999;70:560S-9S.
30. Lopez GE, Schulze M, Meigs J, Manson J, Rifai N, Stampfer M. Consumption of trans fatty acids is related to plasma biomarkers of inflammation and endothelial dysfunction. Nutrition. 2005;135:562-6.
31. Zubay GL, Parson WW, Vance DE. Metabolism of fatty acids. In: Sievers EM, editor. Principles of Biochemistry: Wim.C.Brown Communications,Inc.; 1995. p. 411-34.
32. Semma M. Trans Fatty Acids: Properties, Benefits and Risks. Journal of Health Science. 2002;48:7–13.

33. Trans fat [database on the Internet]. Wikipedia. 2006 [cited March 4th,2009]. Available from: http://en.wikipedia.org/wiki/Trans_fat.
34. Ascherio A. Trans fatty acids and coronary heart disease. *N Engl J Med*. 1999;340 (25):1994–8.
35. Mahfouz M. Effect of dietary trans fatty acids on the delta 5, delta 6 and delta 9 desaturases of rat liver microsomes in vivo. *Acta biologica et medica germanica*. 1981;40 (12):1699–705.
36. Rajan SS, Srinivasan V, Balasubramanyam M, Tatu U. Endoplasmic Reticulum (ER) Stress and Diabetes. *IndianJMed*. 2007;125:411-24.
37. Knight JA. Free radicals, antioxidants, aging, and disease. Washington DC: AACC Press; 1999.
38. Bonnefont-Rousselot D, Bastard JP, Jaudon MC, Delattre J. Consequences of The Diabetic Status on The Axidant/Antioxidant Balance. *Diabetes & Metabolism*. 2000;26:163-76.
39. Tomey KM, Sowers MR, Li X, McConnell DS, Crawford S, Gold EB, et al. Dietary Fat Subgroups, Zinc, and Vegetable Components are Related to Urine F2a-Isoprostane Concentration, a Measure of Oxidative Stress, in Midlife Women. *JNutrition*. 2007;137:2412-9.
40. Lynch SM, Morrow JD, Roberts LJ, B.Frei. Formation of non-cyclooxygenase-derived prostanoids (F2-isoprostanes) in plasma and low density lipoprotein exposed to oxidative stress in vitro. *JClinInvest*. 1994;93:998-1004.

41. Arab L. Biomarkers of Fat and Fatty Acid Intake. *J Nutrition*. 2003;133:925S–32S.
42. Kulkarni RN. The islet beta-cell. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004;36:365-71.
43. Brissova M, Fowler MJ, Nicholson WE, Chu A, Hirshberg B, Harlan DM, et al. Assessment of human pancreatic islet architecture and composition by laser scanning confocal microscopy. *J Histochem Cytochem*. 2005;53:1087-97.
44. de-Koning EJ, Bonner-Weir S, Rabelink TJ. Preservation of beta-cell function by targeting beta-cell mass. *Trends Pharmacol Sci*. 2008;29:218-27.
45. Dervergne B, Wahli W. Peroxisome Proliferator-activated Receptors: nuclear control of metabolism. *Endocrine Reviews*. 1999;20(5):649-88.
46. Ettinger S. Macronutrients: Carbohydrates, Proteins, and Lipids. In: Mahan LK, Escob-Camp S, editors. *Food, Nutrition, and Diet Therapy*. 11 ed. Philadelphia: Saunders; 2004. p. 37-74.
47. Mahley RW, Weisgraber KH, Bersot TP. Disorders of lipid metabolism. In: Kronenberg HM, Melmed S, Polonsky KS, Larsen PR, editors. *Williams textbook of endocrinology*. 11 ed. Philadelphia: Saunders; 2008. p. 1589-652.
48. Halliwell B, Gutteridge J. *Free radicals in biology and medicine*. 3 ed. New York; 1999.
49. Cage SA, Bradberry SM, Meacham S, Vale JM. *Ukipid Monograph Allethrin*. National poison Information services City Hospital NHS trust. Birmingham. 1998.

50. Riedel MJ, Light PE. Saturated and cis/trans Unsaturated Acyl CoA Esters Differentially Regulate Wild-Type and Polymorphic β -Cell ATP-Sensitive K^+ Channels. *Diabetes*. 2005;54:2070–9.
51. Pietropaolo M. Pathogenesis of Diabetes: Our Current Understanding. *Diabetes*. 2008;4:1-13.
52. Unger RH. Reinventing type 2 diabetes: pathogenesis, treatment, and prevention. *Jama*. 2008;299:1185-7.
53. Randle PJ. Regulatory interactions between lipids and carbohydrates: the glucose fatty acid cycle after 35 years. *Diabetes Metab Rev*. 1998;14:263-83.
54. Gregor MF, Hotamisligil GS. Thematic review series: Adipocyte Biology. Adipocyte stress: the endoplasmic reticulum and metabolic disease. *J Lipid Res*. 2007;48:1905-14.
55. Jeffrey KD, Alejandro EU, Luciani DS, Kalynyak TB, Hu X, Li H, et al. Carboxypeptidase E mediates palmitate-induced Beta-cell ER stress and apoptosis. *PNAS* 2008;105:8452–7.
56. Dahlan MS. Langkah-langkah membuat proposal penelitian bidang kedokteran dan kesehatan. Jakarta: Sagung Seto; 2008.
57. Edwards MG, Sarkar D, Klopp R, Morrow JD, Weindruch R, Prolla TA. Age-related impairment of the transcriptional responses to oxidative stress in the mouse heart. *Physiol Genomics*. 2003;13:119–27.
58. Soini Y, Paakko P, Lehto VP. Histopathological Evaluation of Apoptosis in Cancer. *American Journal of Pathology*. 1998;153(4):1041-8.

59. Pizem J, Cor A. Detection of Apoptosis Cells in Tumour Paraffin Section, .
Radiol Onco. 2003;37(4):225-32.
60. James FB. Biological and physiological data on laboratory animals. IACUC
Research Materials kansas state. 2004.
61. KANNER J, ROSENTHAL I. An Assessment of lipid oxidation in foods.
Pure &App/ Chem. 1992;64(12):1959-64.
62. Gosline, Anna. Why fast foods are bad, even in moderation. New Scientist.
2006.
63. Silalahi J, Tampubolon SDR. Asam lemak trans dalam makanan dan
pengaruhnya terhadap kesehatan. JurnalTeknoldan Industri Pangan.
2002;8:184-7.
64. Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radicals in biology and medicine. 3 ed.
New York: Oxford University Press; 1999.
65. Lupi R, Dotta F, Marselli L. Prolonged exposure to free fatty acids has
cytostatic and pro-apoptotic effects on human pancreatic islets: evidence that
b-cell death is caspase mediated, partially dependent on ceramide pathway,
and bcl-2 regulated. Diabetes 2002;51:1437–42.
66. Poitout V, Robertson RP. Minireview: secondary β -cell failure in type 2
diabetes—a convergence of glucotoxicity and lipotoxicity. Endocrinology.
2002;143:339-42.
67. Hirosumi J, Tuncman G, Chang L, Gorgun CZ, Uysal KT, Maeda K. A
central role for JNK in obesity and insulin resistance. Nature. 2002;420:333-6.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Tabel Berat Badan Tikus perminggu (gram)

| Tikus no. | 19-9-07 | 26/9/07 | 10/03/07 | 10/10/07 | 17/10/07 | 24/10/07 | 31/10/07 | 11/07/2007 | 14/11/07 | 21/11/07 | kenaikan |
|-----------|---------|---------|----------|----------|----------|----------|----------|------------|----------|----------|----------|
| 1 | 150 | 173 | 189,7 | 204 | 213 | 224 | 236 | 245 | 254 | 260 | 87 |
| 4 | 137 | 149,4 | 157,8 | 170 | 179,9 | 189,9 | 198 | 200 | 202,5 | 219,9 | 70,5 |
| 17 | 160 | 180 | 191,7 | 207 | 218,7 | 227 | 235 | 230 | 245,5 | 262 | 82 |
| 20 | 190 | 214 | 230 | 242 | 249 | 264 | 277 | 280 | 279,9 | 302,5 | 88,5 |
| 23 | 169 | 194,3 | 209 | 214,6 | 218 | 232,3 | 247 | 251 | 260 | 271 | 76,7 |
| 28 | 186,5 | 211 | 228 | 231 | 239,9 | 249,9 | 260 | 262,5 | 271,7 | 281,3 | 70,3 |
| 10 | 160 | 173,6 | 185,5 | 189,9 | 192 | 197,5 | 204 | 203 | 213 | 216,5 | 42,9 |
| 14 | 123,2 | 140 | 154,5 | 149 | 164 | 169,3 | 179,9 | 185,5 | 190 | 194 | 54 |
| 19 | 148 | 153,7 | 166,2 | 171,5 | 176 | 179,9 | 185,4 | 186,5 | 188,7 | 196,2 | 42,5 |
| 27 | 190 | 230 | 246,9 | 253,5 | 259 | 269,9 | 280 | 286 | 294 | 305,9 | 75,9 |
| 29 | 170,7 | 188,5 | 205,7 | 213 | 219,9 | 226,8 | 240 | 245,5 | 251 | 263,6 | 75,1 |
| 35 | 166 | 180 | 190 | 200 | 200 | 210,6 | 222 | 220 | 224,5 | 232,5 | 52,5 |
| 6 | 198 | 209,1 | 213,6 | 228,3 | 229 | 233,3 | 239,9 | 252,6 | 260 | 269,6 | 60,5 |
| 7 | 221,5 | 230 | 248 | 246 | 269 | 272,4 | 294,8 | 310 | 316,8 | 318 | 88 |
| 8 | 163 | 180 | 195 | 210 | 209 | 225 | 235 | 249,9 | 256 | 265,7 | 85,7 |
| 12 | 197,3 | 214 | 232,6 | 241 | 244 | 250 | 267 | 275,7 | 280 | 289,9 | 75,9 |
| 18 | 184,5 | 210 | 229,5 | 253 | 269,9 | 283,8 | 289,9 | 329 | 347 | 358 | 148 |
| 33 | 190 | 210 | 231,9 | 244 | 245,6 | 242,4 | 264,6 | 274,6 | 279 | 268 | 58 |

Lampiran 2. Intake energi pakan tikus Diet normal (kal/hari)

| Tgl. | E 1 | E 20 | E 23 | E 28 | E 4 | E 17 |
|-----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 26-9-'07 | 39,58 | 27,24 | 33,06 | 33,06 | 36,08 | 26,54 |
| 27-9-'07 | 64,16 | 53,55 | 49,85 | 53,55 | 38,25 | 35,53 |
| 28-9-'07 | 50,36 | 63,19 | 59,80 | 56,90 | 47,94 | 45,28 |
| 29-9-'07 | 72,96 | 67,25 | 72,01 | 68,20 | 55,13 | 49,19 |
| 30-9-'07 | 60,43 | 71,63 | 65,57 | 62,07 | 51,57 | 49,23 |
| 1-10-'07 | 54,02 | 54,02 | 54,02 | 61,35 | 55,73 | 37,40 |
| 2-10-'07 | 55,13 | 65,17 | 60,03 | 58,56 | 68,36 | 46,06 |
| 3-10-'07 | 58,26 | 46,05 | 56,15 | 56,15 | 59,44 | 56,15 |
| 4-10-'07 | 62,27 | 58,90 | 54,82 | 63,47 | 70,20 | 51,21 |
| 5-10-'07 | 63,97 | 53,31 | 53,31 | 53,56 | 78,35 | 53,31 |
| 6-10-'07 | 65,11 | 63,97 | 57,37 | 57,60 | 74,90 | 57,37 |
| 7-10-'07 | 65,04 | 54,60 | 54,36 | 61,16 | 64,80 | 50,96 |
| 8-10-'07 | 75,20 | 54,94 | 52,15 | 69,14 | 79,62 | 40,04 |
| 9-10-'07 | 49,77 | 55,06 | 54,82 | 58,66 | 70,44 | 48,56 |
| 10-10-'07 | 69,93 | 60,28 | 62,63 | 49,92 | 67,34 | 55,81 |
| 11-10-'07 | 73,36 | 53,91 | 53,91 | 60,07 | 69,42 | 49,48 |
| 12-10-'07 | 44,23 | 56,34 | 70,77 | 71,24 | 48,89 | 46,33 |
| 13-10-'07 | 59,01 | 53,31 | 43,39 | 39,92 | 62,73 | 54,05 |
| 14-10-'07 | 71,16 | 65,34 | 76,45 | 68,25 | 69,04 | 50,26 |
| 15-10-'07 | 59,62 | 50,49 | 66,60 | 54,82 | 75,49 | 40,87 |
| 16-10-'07 | 54,82 | 54,82 | 78,86 | 61,79 | 54,82 | 48,56 |

| | | | | | | |
|-----------|-------|--------|-------|-------|-------|-------|
| 17-10-07 | 68,52 | 57,87 | 31,96 | 62,22 | 63,68 | 52,06 |
| 18-10-07 | 55,72 | 55,48 | 69,71 | 55,72 | 55,48 | 42,44 |
| 19-10-07 | 68,68 | 58,06 | 62,54 | 58,53 | 58,06 | 50,98 |
| 20-10-07 | 52,16 | 55,93 | 53,10 | 55,70 | 55,70 | 53,34 |
| 21-10-07 | 58,00 | 56,13 | 66,18 | 56,36 | 56,36 | 47,71 |
| 22-10-07 | 57,91 | 49,06 | 55,04 | 62,94 | 65,33 | 40,92 |
| 23-10-07 | 57,79 | 54,38 | 54,13 | 54,38 | 51,45 | 44,38 |
| 24-10-07 | 74,53 | 59,14 | 64,43 | 55,06 | 63,71 | 44,00 |
| 25-10-07 | 54,82 | 52,17 | 60,35 | 62,99 | 46,40 | 35,34 |
| 26-10-07 | 65,50 | 63,30 | 54,02 | 64,28 | 54,26 | 68,19 |
| 27-10-07 | 64,65 | 63,43 | 69,25 | 74,57 | 56,41 | 43,10 |
| 28-10-07 | 66,64 | 56,04 | 64,05 | 56,04 | 71,11 | 35,56 |
| 29-10-07 | 64,46 | 53,03 | 30,16 | 48,90 | 66,17 | 30,16 |
| 30-10-07 | 55,81 | 47,09 | 59,81 | 41,68 | 65,22 | 41,68 |
| 31-10-07 | 59,54 | 54,15 | 60,52 | 74,97 | 54,15 | 40,18 |
| 1-11-07 | 63,08 | 68,84 | 62,60 | 67,40 | 58,05 | 45,81 |
| 2-11-07 | 74,38 | 61,31 | 59,65 | 36,36 | 63,21 | 40,87 |
| 3-11-07 | 62,48 | 62,48 | 62,48 | 64,72 | 53,31 | 38,18 |
| 4-11-07 | 54,60 | 54,36 | 54,60 | 52,18 | 66,01 | 35,19 |
| 5-11-07 | 69,02 | 57,22 | 74,04 | 74,79 | 60,99 | 39,15 |
| 6-11-07 | 53,92 | 58,13 | 59,12 | 53,68 | 58,38 | 35,62 |
| 7-11-07 | 67,87 | 17,64 | 61,99 | 63,95 | 48,27 | 46,80 |
| 8-11-07 | 68,93 | 76,50 | 76,50 | 72,10 | 67,95 | 49,37 |
| 9-11-07 | 56,36 | 63,84 | 78,58 | 75,30 | 65,72 | 43,97 |
| 10-11-07 | 67,96 | 71,79 | 55,28 | 55,28 | 66,77 | 51,93 |
| 11-11-07 | 55,06 | 64,67 | 68,76 | 54,82 | 55,78 | 54,82 |
| 12-11-07 | 54,02 | 67,70 | 70,39 | 74,06 | 54,51 | 29,57 |
| 13-11-07 | 76,58 | 102,18 | 63,18 | 66,53 | 55,04 | 47,62 |
| 14-11-07 | 59,26 | 78,35 | 79,84 | 69,92 | 69,92 | 53,31 |
| 15-11-07 | 55,18 | 76,31 | 67,11 | 64,37 | 47,47 | 53,19 |
| 16-11-07 | 61,60 | 72,46 | 67,39 | 73,91 | 66,18 | 54,83 |
| 17-11-07 | 54,82 | 64,91 | 55,06 | 54,82 | 69,24 | 51,93 |
| 18-11-07 | 55,06 | 56,98 | 59,14 | 66,12 | 59,62 | 54,34 |
| 19-11-07 | 56,85 | 65,31 | 66,96 | 64,84 | 63,90 | 55,91 |
| 20-11-07 | 56,55 | 65,59 | 74,16 | 69,53 | 66,51 | 56,55 |
| 21-11-07 | 64,85 | 57,87 | 60,79 | 51,11 | 58,09 | 55,17 |
| 22-11-07 | 66,53 | 72,27 | 57,43 | 70,83 | 55,04 | 55,04 |
| 23-11-07 | 64,28 | 61,51 | 76,54 | 64,05 | 54,11 | 59,89 |
| 24-11-07 | 70,86 | 60,68 | 81,68 | 62,38 | 70,01 | 39,46 |
| 25-11-07 | 13,68 | 28,25 | 34,97 | 34,97 | 32,06 | 20,85 |
| 26-11-07 | 33,92 | 35,99 | 56,99 | 40,14 | 42,45 | 36,45 |
| Rata-rata | 60,17 | 58,74 | 60,81 | 59,71 | 59,85 | 46,26 |

Lampiran 3. Intake energi pakan tikus Diet Atherogenik (kal/hari)

| Tgl. | E8 | E33 | E6 | E12 | E7 | E18 |
|---------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 26-9-07 | 18,88 | 36,08 | 37,42 | 35,74 | 69,45 | 25,62 |
| 27-9-07 | 58,31 | 77,29 | 66,94 | 61,76 | 68,66 | 68,66 |
| 28-9-07 | 59,78 | 71,40 | 60,12 | 52,61 | 69,01 | 69,01 |
| 29-9-07 | 68,66 | 89,23 | 80,51 | 68,31 | 87,48 | 80,51 |
| 30-9-07 | 50,68 | 76,02 | 80,00 | 77,83 | 70,59 | 92,31 |
| 1-10-07 | 68,08 | 74,04 | 56,85 | 56,50 | 68,08 | 32,99 |
| 2-10-07 | 67,83 | 61,04 | 62,83 | 67,83 | 67,47 | 87,10 |
| 3-10-07 | 78,42 | 82,60 | 68,31 | 68,66 | 68,66 | 86,79 |
| 4-10-07 | 68,66 | 54,17 | 62,45 | 45,89 | 64,52 | 69,01 |
| 5-10-07 | 83,71 | 83,34 | 66,45 | 66,45 | 70,12 | 84,81 |
| 6-10-07 | 80,39 | 66,39 | 65,09 | 70,62 | 70,62 | 95,68 |

| | | | | | | |
|------------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|
| 7-10-'07 | 62,52 | 69,01 | 69,01 | 69,01 | 69,01 | 86,77 |
| 8-10-'07 | 71,25 | 59,64 | 56,42 | 48,04 | 57,39 | 71,25 |
| 9-10-'07 | 68,78 | 71,26 | 56,37 | 67,72 | 56,37 | 80,48 |
| 10-10-'07 | 39,99 | 64,19 | 69,56 | 61,50 | 61,50 | 72,25 |
| 11-10-'07 | 78,18 | 68,54 | 62,83 | 42,48 | 67,83 | 31,77 |
| 12-10-'07 | 70,64 | 64,40 | 58,81 | 55,53 | 70,31 | 63,08 |
| 13-10-'07 | 16,31 | 67,72 | 54,24 | 64,88 | 78,71 | 75,51 |
| 14-10-'07 | 47,17 | 80,43 | 69,23 | 61,09 | 66,18 | 77,38 |
| 15-10-'07 | 49,69 | 61,76 | 54,86 | 57,97 | 62,80 | 65,21 |
| 16-10-'07 | 68,31 | 63,38 | 51,41 | 50,35 | 92,96 | 37,32 |
| 17-10-'07 | 79,23 | 25,29 | 16,86 | 44,50 | 63,72 | 77,88 |
| 18-10-'07 | 67,84 | 55,82 | 60,42 | 70,66 | 68,19 | 32,50 |
| 19-10-'07 | 70,31 | 86,74 | 61,77 | 63,74 | 70,64 | 70,31 |
| 20-10-'07 | 68,07 | 32,26 | 61,33 | 67,72 | 74,81 | 67,72 |
| 21-10-'07 | 70,52 | 68,78 | 68,78 | 68,43 | 74,68 | 95,87 |
| 22-10-'07 | 68,66 | 68,66 | 54,52 | 50,72 | 60,38 | 70,39 |
| 23-10-'07 | 78,52 | 40,49 | 65,49 | 60,91 | 67,96 | 78,17 |
| 24-10-'07 | 70,33 | 66,01 | 66,01 | 66,01 | 59,71 | 96,53 |
| 25-10-'07 | 42,22 | 50,73 | 36,77 | 43,24 | 44,60 | 69,46 |
| 26-10-'07 | 69,35 | 69,01 | 69,01 | 64,91 | 78,57 | 87,80 |
| 27-10-'07 | 67,95 | 67,59 | 32,02 | 67,59 | 78,27 | 86,45 |
| 28-10-'07 | 86,44 | 68,66 | 68,31 | 68,66 | 69,71 | 87,48 |
| 29-10-'07 | 5,16 | 17,19 | 34,73 | 24,76 | 40,58 | 30,61 |
| 30-10-'07 | 34,16 | 48,65 | 34,16 | 42,79 | 50,38 | 18,63 |
| 31-10-'07 | 46,19 | 51,92 | 54,62 | 50,24 | 64,40 | 69,45 |
| 1-11-'07 | 77,29 | 68,66 | 87,99 | 69,01 | 92,82 | 92,82 |
| 2-11-'07 | 77,54 | 85,10 | 81,81 | 70,31 | 70,64 | 102,18 |
| 3-11-'07 | 67,33 | 68,78 | 75,29 | 79,64 | 72,04 | 101,00 |
| 4-11-'07 | 83,23 | 86,38 | 86,73 | 68,55 | 77,29 | 68,55 |
| 5-11-'07 | 92,70 | 68,78 | 65,79 | 66,16 | 77,00 | 99,06 |
| 6-11-'07 | 78,16 | 73,29 | 68,43 | 71,21 | 90,66 | 100,39 |
| 7-11-'07 | 80,74 | 68,66 | 69,01 | 69,01 | 73,15 | 99,72 |
| 8-11-'07 | 90,49 | 68,31 | 95,42 | 79,22 | 88,73 | 103,17 |
| 9-11-'07 | 76,32 | 64,30 | 60,77 | 67,84 | 81,26 | 86,21 |
| 10-11-'07 | 86,73 | 68,20 | 56,65 | 68,20 | 76,24 | 96,52 |
| 11-11-'07 | 82,90 | 62,99 | 68,78 | 67,33 | 75,66 | 96,65 |
| 12-11-'07 | 96,94 | 78,93 | 82,40 | 61,62 | 88,28 | 103,17 |
| 13-11-'07 | 68,31 | 68,31 | 61,27 | 67,96 | 78,52 | 85,56 |
| 14-11-'07 | 79,26 | 70,42 | 53,39 | 70,74 | 73,69 | 95,31 |
| 15-11-'07 | 82,33 | 82,67 | 88,93 | 70,52 | 58,01 | 95,18 |
| 16-11-'07 | 79,78 | 75,66 | 72,91 | 69,12 | 60,53 | 90,44 |
| 17-11-'07 | 70,22 | 65,23 | 61,57 | 69,22 | 86,20 | 84,20 |
| 18-11-'07 | 75,10 | 68,43 | 71,24 | 56,15 | 94,40 | 68,08 |
| 19-11-'07 | 91,94 | 75,10 | 68,08 | 68,08 | 77,20 | 81,06 |
| 20-11-'07 | 77,63 | 59,59 | 69,12 | 67,76 | 69,12 | 69,12 |
| 21-11-'07 | 81,63 | 56,24 | 80,67 | 68,46 | 68,46 | 57,21 |
| 22-11-'07 | 65,47 | 54,50 | 68,89 | 66,49 | 73,35 | 66,15 |
| 23-11-'07 | 79,50 | 51,23 | 68,19 | 68,19 | 64,30 | 71,37 |
| 24-11-'07 | 75,28 | 24,54 | 69,15 | 59,95 | 62,46 | 59,95 |
| 25-11-'07 | 16,68 | 25,54 | 30,30 | 24,86 | 20,09 | 23,49 |
| 26-11-'07 | 41,27 | 41,27 | 34,73 | 37,14 | 34,73 | 35,42 |
| Rata- rata | 67,35 | 63,56 | 62,77 | 61,43 | 69,50 | 74,59 |

Lampiran 4. Intake energi pakan tikus Diet Minyak Jelantah (kal/hari)

| Tgl. | E29 | E35 | E27 | E10 | E19 | E14 |
|-------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| 26-9-'07 | 19,77 | 47,51 | 33,64 | 40,58 | 33,64 | 33,64 |
| 27-9-'07 | 84,74 | 58,22 | 72,00 | 42,72 | 37,55 | 43,40 |
| 28-9-'07 | 87,15 | 53,39 | 75,79 | 45,82 | 44,44 | 49,60 |
| 29-9-'07 | 38,75 | 37,09 | 42,06 | 36,76 | 36,76 | 36,76 |
| 30-9-'07 | 71,85 | 46,37 | 67,60 | 50,61 | 41,06 | 45,31 |
| 1-10-'07 | 64,98 | 55,99 | 71,55 | 45,28 | 41,13 | 36,64 |
| 2-10-'07 | 55,70 | 49,40 | 67,97 | 44,49 | 36,44 | 36,44 |
| 3-10-'07 | 70,61 | 43,73 | 58,95 | 39,84 | 38,22 | 46,32 |
| 4-10-'07 | 56,37 | 38,12 | 62,45 | 46,23 | 31,63 | 30,01 |
| 5-10-'07 | 67,11 | 47,01 | 31,22 | 35,89 | 53,83 | 44,14 |
| 6-10-'07 | 70,55 | 53,62 | 87,13 | 58,55 | 35,98 | 54,32 |
| 7-10-'07 | 66,09 | 38,58 | 60,05 | 45,63 | 36,23 | 36,23 |
| 8-10-'07 | 59,74 | 41,89 | 61,80 | 42,57 | 43,95 | 34,68 |
| 9-10-'07 | 58,46 | 45,24 | 66,11 | 50,11 | 43,15 | 103,00 |
| 10-10-'07 | 52,34 | 44,58 | 58,76 | 37,82 | 35,80 | 35,80 |
| 11-10-'07 | 49,20 | 39,03 | 56,75 | 37,72 | 44,61 | 29,52 |
| 12-10-'07 | 45,37 | 37,09 | 69,88 | 42,39 | 37,09 | 36,10 |
| 13-10-'07 | 68,67 | 39,48 | 68,67 | 36,74 | 34,33 | 34,33 |
| 14-10-'07 | 61,66 | 35,58 | 58,95 | 35,58 | 44,72 | 35,58 |
| 15-10-'07 | 45,51 | 34,56 | 39,35 | 37,64 | 34,56 | 34,90 |
| 16-10-'07 | 54,61 | 36,98 | 40,44 | 68,78 | 63,94 | 34,56 |
| 17-10-'07 | 57,34 | 34,68 | 47,72 | 47,72 | 34,68 | 49,44 |
| 18-10-'07 | 35,35 | 61,53 | 56,43 | 35,01 | 32,97 | 35,01 |
| 19-10-'07 | 64,95 | 38,38 | 70,20 | 41,33 | 37,39 | 42,31 |
| 20-10-'07 | 62,00 | 38,33 | 63,00 | 36,33 | 36,67 | 42,00 |
| 21-10-'07 | 60,08 | 43,26 | 59,05 | 41,20 | 37,77 | 39,14 |
| 22-10-'07 | 34,90 | 37,98 | 48,25 | 26,35 | 25,66 | 23,61 |
| 23-10-'07 | 63,85 | 53,62 | 67,73 | 38,10 | 41,27 | 44,80 |
| 24-10-'07 | 73,17 | 50,98 | 66,93 | 33,99 | 44,39 | 48,20 |
| 25-10-'07 | 52,36 | 43,75 | 62,70 | 47,19 | 34,10 | 34,45 |
| 26-10-'07 | 69,01 | 44,63 | 63,17 | 34,33 | 34,68 | 35,71 |
| 27-10-'07 | 67,73 | 61,38 | 67,73 | 32,80 | 41,98 | 45,50 |
| 28-10-'07 | 57,96 | 39,41 | 62,93 | 41,07 | 41,40 | 40,07 |
| 29-10-'07 | 31,95 | 35,01 | 41,47 | 25,83 | 19,04 | 17,68 |
| 30-10-'07 | 65,63 | 40,51 | 48,05 | 40,19 | 32,34 | 40,19 |
| 31-10-'07 | 51,32 | 40,15 | 68,43 | 49,23 | 33,52 | 38,76 |
| 1-11-'07 | 55,52 | 66,84 | 51,86 | 28,49 | 29,95 | 30,32 |
| 2-11-'07 | 78,20 | 47,88 | 68,55 | 34,45 | 42,72 | 54,43 |
| 3-11-'07 | 66,86 | 44,09 | 67,22 | 49,51 | 43,73 | 49,15 |
| 4-11-'07 | 69,01 | 35,35 | 60,85 | 39,09 | 35,01 | 40,45 |
| 5-11-'07 | 84,76 | 44,47 | 60,05 | 49,41 | 53,59 | 53,97 |
| 6-11-'07 | 73,18 | 35,91 | 58,95 | 45,06 | 39,30 | 42,01 |
| 7-11-'07 | 67,47 | 35,89 | 65,68 | 55,63 | 49,17 | 48,81 |
| 8-11-'07 | 74,48 | 39,93 | 70,67 | 52,61 | 44,69 | 42,78 |
| 9-11-'07 | 60,92 | 35,68 | 61,26 | 45,10 | 35,68 | 35,68 |
| 10-11-'07 | 60,43 | 34,68 | 55,96 | 52,19 | 41,20 | 34,68 |
| 11-11-'07 | 65,61 | 41,81 | 69,01 | 52,69 | 45,89 | 35,35 |

| | | | | | | |
|------------|-------|-------|-------|--------|-------|-------|
| 12-11-07 | 69,57 | 39,17 | 65,51 | 48,97 | 35,80 | 42,21 |
| 13-11-07 | 66,31 | 39,05 | 66,31 | 48,47 | 39,05 | 36,02 |
| 14-11-07 | 56,85 | 44,48 | 69,56 | 37,45 | 41,13 | 36,45 |
| 15-11-07 | 69,35 | 71,41 | 68,67 | 34,68 | 40,51 | 39,83 |
| 16-11-07 | 63,23 | 34,20 | 63,23 | 34,60 | 41,36 | 36,19 |
| 17-11-07 | 68,90 | 51,33 | 64,07 | 52,36 | 52,02 | 47,88 |
| 18-11-07 | 64,25 | 48,61 | 59,83 | 39,43 | 43,17 | 35,35 |
| 19-11-07 | 69,70 | 44,63 | 68,67 | 34,33 | 47,04 | 35,71 |
| 20-11-07 | 76,41 | 41,40 | 59,91 | 43,42 | 48,47 | 36,02 |
| 21-11-07 | 51,66 | 40,70 | 63,87 | 50,40 | 40,70 | 40,70 |
| 22-11-07 | 68,55 | 53,59 | 68,55 | 51,15 | 54,63 | 39,67 |
| 23-11-07 | 68,55 | 53,05 | 68,55 | 103,00 | 52,36 | 38,93 |
| 24-11-07 | 65,01 | 45,48 | 49,49 | 40,66 | 44,14 | 35,05 |
| 25-11-07 | 15,50 | 29,97 | 34,10 | 24,80 | 22,39 | 20,67 |
| 26-11-07 | 37,77 | 32,96 | 34,68 | 37,42 | 34,33 | 23,35 |
| Rata- rata | 60,72 | 43,86 | 60,32 | 43,19 | 39,92 | 39,67 |

Lampiran 5. Hasil Perhitungan Ekspresi F2-Isoprostanes (sel/lapangan pandang)

| Tikus Wistar | Ekspresi F2-Isoprostanes (sel/lapangan pandang) | | |
|----------------------|---|------------|--------|
| | Pengamat A | Pengamat B | Rerata |
| Diet Normal | | | |
| 1 | 2 | 4 | 3 |
| 2 | 3 | 3 | 3 |
| 3 | 3 | 2 | 3 |
| 4 | 6 | 2 | 3 |
| 5 | 8 | 10 | 9 |
| 6 | 3 | 2 | 3 |
| Diet Minyak Jelantah | | | |
| 1 | 30 | 28 | 29 |
| 2 | 31 | 29 | 30 |
| 3 | 43 | 31 | 37 |
| 4 | 44 | 34 | 39 |
| 5 | 33 | 38 | 36 |
| 6 | 29 | 27 | 28 |
| Diet Atherogenik | | | |
| 1 | 43 | 38 | 41 |
| 2 | 49 | 34 | 42 |
| 3 | 51 | 32 | 42 |
| 4 | 31 | 21 | 26 |
| 5 | 44 | 43 | 29 |
| 6 | 31 | 31 | 31 |

Lampiran 6. Hasil Perhitungan Apoptosis Sel β Pankreas (sel/lapangan pandang)

| Tikus Wistar | Apoptosis Sel β Pankreas (sel/lapangan pandang) | | |
|----------------------|---|------------|--------|
| | Pengamat A | Pengamat B | Rerata |
| Diet Normal | | | |
| 1 | 4 | 2 | 3 |
| 2 | 1 | 1 | 1 |
| 3 | 2 | 2 | 2 |
| 4 | 2 | 0 | 1 |
| 5 | 5 | 3 | 4 |
| 6 | 3 | 3 | 3 |
| Diet Minyak Jelantah | | | |
| 1 | 16 | 18 | 17 |
| 2 | 10 | 7 | 9 |
| 3 | 10 | 12 | 11 |
| 4 | 17 | 17 | 17 |
| 5 | 11 | 15 | 13 |
| 6 | 11 | 11 | 11 |
| Diet Atherogenik | | | |
| 1 | 14 | 10 | 12 |
| 2 | 9 | 11 | 10 |
| 3 | 16 | 17 | 17 |
| 4 | 10 | 10 | 10 |
| 5 | 17 | 13 | 15 |
| 6 | 13 | 13 | 13 |

Lampiran 7. Analisis Data Penelitian Menggunakan SPSS

| Descriptives | | | | | | |
|-----------------|----------------------|----------------------------------|-----------|------------|--|--|
| Diet | | | Statistic | Std. Error | | |
| F2_Isoprostanes | Diet Normal | Mean | 4,00 | 1,000 | | |
| | | 95% Confidence Interval for Mean | 1,43 | | | |
| | | Lower Bound | 6,57 | | | |
| | | Upper Bound | | | | |
| | | 5% Trimmed Mean | 3,78 | | | |
| | | Median | 3,00 | | | |
| | | Variance | 6,000 | | | |
| | | Std. Deviation | 2,449 | | | |
| | | Minimum | 3 | | | |
| | | Maximum | 9 | | | |
| | | Range | 6 | | | |
| | | Interquartile Range | 2 | | | |
| | | Skewness | 2,449 | ,845 | | |
| | | Kurtosis | 6,000 | 1,741 | | |
| | Diet Minyak Jelantah | Mean | 33,17 | 1,922 | | |
| | | 95% Confidence Interval for Mean | 28,23 | | | |
| | | Lower Bound | 38,11 | | | |
| | | Upper Bound | | | | |
| | | 5% Trimmed Mean | 33,13 | | | |
| | | Median | 33,00 | | | |
| | | Variance | 22,167 | | | |
| | | Std. Deviation | 4,708 | | | |
| | | Minimum | 28 | | | |
| | | Maximum | 39 | | | |
| | | Range | 11 | | | |
| | | Interquartile Range | 9 | | | |
| | | Skewness | ,102 | ,845 | | |
| | | Kurtosis | -2,613 | 1,741 | | |
| | Diet atherogenik | Mean | 35,17 | 2,982 | | |
| | | 95% Confidence Interval for Mean | 27,50 | | | |
| | | Lower Bound | 42,83 | | | |
| | | Upper Bound | | | | |
| | | 5% Trimmed Mean | 35,30 | | | |
| | | Median | 36,00 | | | |
| | | Variance | 53,367 | | | |
| | | Std. Deviation | 7,305 | | | |
| | | Minimum | 26 | | | |
| | | Maximum | 42 | | | |
| | | Range | 16 | | | |
| | | Interquartile Range | 14 | | | |
| | | Skewness | -,185 | ,845 | | |
| | | Kurtosis | -2,729 | 1,741 | | |

Tests of Normality

| Diet | | Kolmogorov-Smirnov ^a | | | Shapiro-Wilk | | |
|-----------------|----------------------|---------------------------------|----|-------|--------------|----|------|
| | | Statistic | df | Sig. | Statistic | df | Sig. |
| F2_Isoprostanes | Diet Normal | ,492 | 6 | ,000 | ,496 | 6 | ,000 |
| | Diet Minyak Jelantah | ,249 | 6 | ,200* | ,875 | 6 | ,247 |
| | Diet atherogenik | ,288 | 6 | ,132 | ,823 | 6 | ,094 |

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

→ NPar Tests

Kruskal-Wallis Test

Ranks

| KLP_DIET | | N | Mean Rank |
|-----------------|-------------|----|-----------|
| F2_Isoprostanes | Normal | 6 | 3,50 |
| | Jelantah | 6 | 11,75 |
| | Atherogenik | 6 | 13,25 |
| | Total | 18 | |

Test Statistics^{a,b}

| F2_Isoprostanes | |
|-----------------|--------|
| Chi-Square | 11,875 |
| df | 2 |
| Asymp. Sig. | ,003 |

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: KLP_DIET

➔ NPar Tests

Mann-Whitney Test

Ranks

| | KLP_DIET | N | Mean Rank | Sum of Ranks |
|-----------------|----------|----|-----------|--------------|
| F2_Isoprostanes | Normal | 6 | 3,50 | 21,00 |
| | Jelantah | 6 | 9,50 | 57,00 |
| | Total | 12 | | |

Test Statistics^b

| | F2_ Isoprostanes |
|-----------------------------------|---------------------|
| Mann-Whitney U | ,000 |
| Wilcoxon W | 21,000 |
| Z | -2,989 |
| Asymp. Sig. (2-tailed) | ,003 |
| Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)] | ,002 ^a |

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: KLP_DIET

➔ NPar Tests

Mann-Whitney Test

Ranks

| | KLP_DIET | N | Mean Rank | Sum of Ranks |
|-----------------|-------------|----|-----------|--------------|
| F2_Isoprostanes | Normal | 6 | 3,50 | 21,00 |
| | Atherogenik | 6 | 9,50 | 57,00 |
| | Total | 12 | | |

Test Statistics^b

| | F2_ Isoprostanes |
|-----------------------------------|---------------------|
| Mann-Whitney U | ,000 |
| Wilcoxon W | 21,000 |
| Z | -2,994 |
| Asymp. Sig. (2-tailed) | ,003 |
| Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)] | ,002 ^a |

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: KLP_DIET

➔ NPar Tests

Mann-Whitney Test

Ranks

| | KLP_DIET | N | Mean Rank | Sum of Ranks |
|-----------------|-------------|----|-----------|--------------|
| F2_Isoprostanes | Jelantah | 6 | 5,75 | 34,50 |
| | Atherogenik | 6 | 7,25 | 43,50 |
| | Total | 12 | | |

Test Statistics^b

| | F2_ Isoprostanes |
|-----------------------------------|---------------------|
| Mann-Whitney U | 13,500 |
| Wilcoxon W | 34,500 |
| Z | -,723 |
| Asymp. Sig. (2-tailed) | ,470 |
| Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)] | ,485 ^a |

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: KLP_DIET

Descriptives

| KLP_DIET | | | | Statistic | Std. Error |
|---------------------------------|-------------|----------------------------------|-------------|-----------|------------|
| Sel Beta Pankreas yang Rusak | Normal | Mean | | 2,33 | ,494 |
| | | 95% Confidence Interval for Mean | Lower Bound | 1,06 | |
| | | | Upper Bound | 3,60 | |
| | | 5% Trimmed Mean | | 2,31 | |
| | | Median | | 2,50 | |
| | | Variance | | 1,467 | |
| | | Std. Deviation | | 1,211 | |
| | | Minimum | | 1 | |
| | | Maximum | | 4 | |
| | | Range | | 3 | |
| | | Interquartile Range | | 2 | |
| | | Skewness | | ,075 | ,845 |
| | | Kurtosis | | -1,550 | 1,741 |
| | Jelantah | Mean | | 13,00 | 1,366 |
| | | 95% Confidence Interval for Mean | Lower Bound | 9,49 | |
| | | | Upper Bound | 16,51 | |
| | | 5% Trimmed Mean | | 13,00 | |
| | | Median | | 12,00 | |
| | | Variance | | 11,200 | |
| | | Std. Deviation | | 3,347 | |
| | | Minimum | | 9 | |
| | | Maximum | | 17 | |
| | | Range | | 8 | |
| | | Interquartile Range | | 7 | |
| | | Skewness | | ,384 | ,845 |
| | | Kurtosis | | -1,786 | 1,741 |
| | Atherogenik | Mean | | 12,83 | 1,138 |
| | | 95% Confidence Interval for Mean | Lower Bound | 9,91 | |
| | | | Upper Bound | 15,76 | |
| | | 5% Trimmed Mean | | 12,76 | |
| | | Median | | 12,50 | |
| | | Variance | | 7,767 | |
| | | Std. Deviation | | 2,787 | |
| | | Minimum | | 10 | |
| | | Maximum | | 17 | |
| | | Range | | 7 | |
| | | Interquartile Range | | 6 | |
| | | Skewness | | ,505 | ,845 |
| | | Kurtosis | | -,995 | 1,741 |

Tests of Normality

| KLP_DIET | | Kolmogorov-Smirnov ^a | | | Shapiro-Wilk | | |
|------------------------------|-------------|---------------------------------|----|-------|--------------|----|------|
| | | Statistic | df | Sig. | Statistic | df | Sig. |
| Sel Beta Pankreas yang Rusak | Normal | ,209 | 6 | ,200* | ,907 | 6 | ,415 |
| | Jelantah | ,225 | 6 | ,200* | ,876 | 6 | ,252 |
| | Atherogenik | ,179 | 6 | ,200* | ,925 | 6 | ,540 |

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

Tests of Normality

| KLP_DIET | | Kolmogorov-Smirnov ^a | | | Shapiro-Wilk | | |
|---------------|-------------|---------------------------------|----|-------|--------------|----|------|
| | | Statistic | df | Sig. | Statistic | df | Sig. |
| trans_selbeta | Normal | ,242 | 6 | ,200* | ,863 | 6 | ,201 |
| | Jelantah | ,208 | 6 | ,200* | ,902 | 6 | ,385 |
| | Atherogenik | ,192 | 6 | ,200* | ,927 | 6 | ,558 |

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

➔ Oneway

Test of Homogeneity of Variances

tranfor_beta_sel

| Levene Statistic | df1 | df2 | Sig. |
|------------------|-----|-----|------|
| ,172 | 2 | 15 | ,843 |

ANOVA

tranfor_beta_sel

| | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|----------------|----------------|----|-------------|--------|------|
| Between Groups | 17,527 | 2 | 8,764 | 49,218 | ,000 |
| Within Groups | 2,671 | 15 | ,178 | | |
| Total | 20,198 | 17 | | | |

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: tranfor_beta_sel

LSD

| (I) KLP_DIET | (J) KLP_DIET | Mean Difference (I-J) | Std. Error | Sig. | 95% Confidence Interval | |
|--------------|--------------|-----------------------|------------|------|-------------------------|-------------|
| | | | | | Lower Bound | Upper Bound |
| Normal | Jelantah | -2,10112* | ,24362 | ,000 | -2,6204 | -1,5818 |
| | Atherogenik | -2,08533* | ,24362 | ,000 | -2,6046 | -1,5661 |
| Jelantah | Normal | 2,10112* | ,24362 | ,000 | 1,5818 | 2,6204 |
| | Atherogenik | ,01579 | ,24362 | ,949 | -,5035 | ,5351 |
| Atherogenik | Normal | 2,08533* | ,24362 | ,000 | 1,5661 | 2,6046 |
| | Jelantah | -,01579 | ,24362 | ,949 | -,5351 | ,5035 |

*. The mean difference is significant at the .05 level.